

---

**Regenerasi Rumput Laut *Gracilaria* sp. melalui Propagasi Secara Ex vitro**  
*Regeneration of Seaweed *Gracilaria* sp. through Ex vitro Propagation*

Siti Fadilah\*, Dhini Arum Pratiwi

Loka Riset Budidaya Rumput Laut

\*Corresponding author e-mail: [siti\\_fadilah9@gmail.com](mailto:siti_fadilah9@gmail.com)

Submitted: 29 Juli 2019 / Revised: 30 Desember 2019 / Accepted: 30 Desember 2019

<http://doi.org/10.21107/jk.v12i2.5783>

**ABSTRACT**

This study aims to observe the growth of *Gracilaria* sp. seaweed seedlings through ex vitro propagation. Thallus was cut into thallus fragments measuring  $\pm 2-3$  cm. The treatments tested were different types of nutrients and thallus densities. The nutrients used were Provasoli Enriched Sea Water (PES) 20 mL/L, organic fertilizer A (0,05 mL/L), organic fertilizer B (0,05 mL/L) and without fertilizer; while the densities of the thallus fragment tested were 2 g/L; 2,5 g/L and 3 g/L. Thallus fragments were maintained for 8 weeks with media renewal and thallus weighing every week. Shoot length was measured and number of shoots was calculated at the end of the observation. Then, the seedlings were acclimatized at the sea for 8 weeks by binding every 10 thallus fragments to each clump rope in a net box with a side length of 50 cm. Growth was observed by weighing thallus fragments every 4 weeks. The results showed that organic fertilizer A provided better seedling growth compared to other types of fertilizers. The highest Daily Growth Rate (DGR) and shoot length occurred at a density of 2 g/L, but the number of shoots at three densities did not differ at an average of 5 shoots per thallus fragment. The highest average DGR of seedlings during acclimatization reached 4,85%/day in the first month, then decreased to 2,05%/day in the second month. Ex vitro propagation can be used as an alternative effort to propagate the seedlings of *Gracilaria* sp. by paying attention to the physical condition of the growth environment, especially the temperature and light intensity.

**Keywords:** ex vitro, *Gracilaria* sp., propagation, regeneration

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pertumbuhan bibit rumput laut *Gracilaria* sp. melalui propagasi ex vitro. Talus dipotong menjadi fragmen talus berukuran  $\pm 2-3$  cm. Perlakuan yang diuji yaitu jenis nutrisi dan kepadatan talus yang berbeda. Nutrisi yang digunakan adalah Provasoli's Enriched Seawater (PES) sebanyak 20 mL/L, pupuk organik A (0,05 mL/L), pupuk organik B (0,05 mL/L) dan tanpa pupuk; sedangkan kepadatan fragmen talus yang diuji adalah 2 g/L; 2,5 g/L dan 3 g/L. Fragmen talus dipelihara selama 8 minggu dengan pembaruan media dan penimbangan bobot talus setiap minggu. Panjang tunas diukur dan jumlah tunas dihitung di akhir pengamatan. Kemudian, bibit diaklimatisasi di laut selama 8 minggu dengan mengikat tiap 10 fragmen talus pada tiap tali rumpun dalam kotak hapa dengan panjang sisi 50 cm. Pertumbuhan diamati dengan menimbang fragmen talus setiap 4 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pupuk organik A memberikan pertumbuhan bibit yang lebih baik dibandingkan jenis pupuk yang lain. Laju Pertumbuhan Harian (LPH) dan panjang tunas tertinggi terjadi pada kepadatan 2 g/L, namun jumlah tunas pada tiga kepadatan tidak berbeda yaitu rata-rata 5 tunas per fragmen talus. Rataan LPH tertinggi saat aklimatisasi mencapai 4,85 %/hari pada bulan pertama, kemudian menurun menjadi 2,05 %/hari di bulan kedua. Propagasi ex vitro dapat dijadikan salah satu upaya alternatif perbanyak bibit *Gracilaria* sp. dengan memperhatikan kondisi fisik pemeliharaan, terutama suhu dan intensitas cahaya.

**Kata kunci :** ex vitro, *Gracilaria* sp., propagasi, regenerasi

---

## PENDAHULUAN

Rumput laut *Gracilaria sp.* adalah rumput laut penghasil agar (agarophyta) dari kelas Rhodophyceae. Seperti halnya permasalahan pada budidaya rumput laut lainnya, *Gracilaria sp.* juga mengalami hambatan pertumbuhan pada saat kondisi lingkungan tidak sesuai. Hal ini mengakibatkan ketersediaan bibit seringkali menjadi terbatas. Selain itu, menurut Hurtado & Cheney, (2003), kualitas bibit rumput laut seringkali menurun karena dalam praktek budidaya masih menggunakan fragmen talus berulang secara vegetatif dari hasil panen.

Salah satu upaya mengatasi hambatan ini adalah melakukan perbanyakan vegetatif rumput laut melalui propagasi *in vitro* (kultur jaringan). Cara ini menjadi salah satu upaya untuk memperbanyak bibit unggul sebelum budidaya lapang, sehingga dapat menjaga ketersediaan bibit pada saat musim kurang sesuai. Propagasi *in vitro* menguntungkan karena didapatkan sifat anakan yang sama dengan induknya dalam jumlah banyak (Akin-Idowu *et al.*, 2009). Propagasi *in vitro* telah dilakukan pada *Gracilaria verrucosa* sampai pada tahap aklimatisasi dan budidaya (Mulyaningrum *et al.*, 2014). Namun, propagasi *in vitro* ini relatif mahal karena membutuhkan kondisi pemeliharaan khusus dan sumber daya manusia (SDM) dengan keterampilan khusus. Jika dilakukan dalam skala besar maka membutuhkan perhitungan efisiensi ekonomi. Untuk itu dalam penelitian ini dilakukan percobaan propagasi secara *ex vitro* pada rumput laut *Gracilaria sp.*

Propagasi *ex vitro* yang dimaksud dalam penelitian ini adalah perbanyakan fragmen talus rumput laut dalam kondisi *ex vitro* di green house. Kondisi ini berbeda dengan propagasi *in vitro* yang dilakukan dalam botol kaca di laboratorium. Pada propagasi *in vitro*, plantlet tumbuh dalam kondisi khusus di wadah yang relatif kedap udara, kelembaban udara lebih tinggi dan intensitas cahaya lebih rendah dibandingkan lingkungannya. Media pertumbuhan juga seringkali dilengkapi dengan sakarida dan zat pengatur tumbuh (Posposilova *et al.*, 1999).

Percobaan ini dilakukan untuk mengamati kemungkinan perbanyakan fragmen talus bibit rumput laut, khususnya *Gracilaria sp.*, dapat dilakukan dengan cara yang lebih mudah dan tidak membutuhkan sarana khusus sehingga mudah diadopsi pembudidaya. Hal ini mengacu pada pengamatan di lapangan bahwa perbanyakan bibit selama ini sudah

biasa dilakukan pembudidaya dari hasil fragmentasi talus rumput laut *Gracilaria sp.* yang langsung ditebar ke perairan tambak. *Gracilaria* juga telah diketahui mempunyai toleransi lebih luas terhadap kondisi lingkungan (*euryhaline*) sehingga lebih mudah ditumbuhkan dan dipelihara. Dengan melakukan propagasi *ex vitro* ini juga diharapkan dapat meminimalkan fluktuasi lingkungan saat aklimatisasi ke perairan yang selama ini menjadi permasalahan setelah tahap propagasi *in vitro*.

Metode *ex vitro* biasanya dilakukan saat tahap pembentukan akar (rhizogenesis) pada tumbuhan tingkat tinggi. Kondisi *ex vitro* yang diberikan dapat berupa aklimatisasi di *greenhouse* atau pemindahan bibit ke budidaya lapang (Jose *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2015). Metode *ex vitro* dalam rhizogenesis *Passiflora foetida* telah diketahui dapat mengurangi waktu, tenaga dan biaya produksi serta meningkatkan sintasan pada kondisi lapang (Shekhawat *et al.*, 2015). Rhizogenesis secara *ex vitro* dengan aklimatisasi simultan dapat menurunkan biaya produksi perbanyakan tanaman *Camellia sinensis* sebanyak 71% dibandingkan dengan metode *in vitro* (Ranaweera *et al.*, 2013). Namun lebih jauh metode *ex vitro* sudah dilakukan pada perbanyakan tanaman *Coffea arabica*. Embrio somatik *C. arabica* ditebar langsung pada substrat tanah dan dapat menghasilkan plantlet. Cara ini menghasilkan plantlet lebih cepat, serta menghilangkan prosedur aklimatisasi konvensional yang problematis dan mahal (Barry-Etienne *et al.*, 2002). Seperti yang telah diketahui bahwa permasalahan dalam aklimatisasi konvensional adalah plantlet biasanya mempunyai sintasan rendah. Menurut Chandra *et al.*, (2010), keberhasilan kultur dalam skala komersial tergantung pada kemampuan terhadap pemindahan plantlet dalam skala besar, biaya rendah dan sintasan tinggi. Selama pemindahan, seringkali plantlet *in vitro* tidak mampu mengatasi kondisi lingkungan. Untuk meningkatkan pertumbuhan dan mengurangi kematian plantlet selama tahap aklimatisasi diperlukan pengendalian lingkungan fisik dan kimia (Chandra *et al.*, 2010).

Penelitian propagasi *ex vitro* *Gracilaria sp.* ini dilakukan sebagai upaya perbanyakan bibit dengan harapan mengurangi waktu regenerasi di laboratorium dan meningkatkan sintasan di kondisi lapang. Penelitian ini bertujuan untuk mengobservasi pertumbuhan bibit rumput laut *Gracilaria sp.* melalui perbanyakan *ex vitro*.

## MATERI DAN METODE

Stok bibit didapatkan dari pembudidaya *Gracilaria sp.* di perairan laut Takalar, Sulawesi Selatan. Bibit yang digunakan adalah bibit yang segar, berwarna hijau kecoklatan, tidak ada bercak putih pada talus dan bebas epifit. Penelitian dilaksanakan tahun 2016 di Laboratorium Aklimatisasi, Loka Riset Budidaya Rumput Laut, Gorontalo.

Propagasi *ex vitro* diawali dengan pemilihan dan pemotongan bibit rumput laut menjadi fragmen talus berukuran  $\pm 2-3$  cm. Percobaan pertama menguji kepadatan fragmen talus yang berbeda yaitu 2 g/L; 2,5 g/L dan 3 g/L. Media yang digunakan adalah air laut bersalinitas sekitar 32-34 ppt sebanyak 20 liter yang ditambah dengan pupuk organik 0,05 ml/l. Percobaan kedua menguji jenis nutrisi yang berbeda yaitu pupuk *Provasoli's Enriched Seawater* (PES) sebanyak 20 mL/L, pupuk organik A (0,05 mL/L), pupuk organik B (0,05 mL/L) dan tanpa penambahan pupuk sebagai kontrol. Wadah pemeliharaan berupa kontainer plastik bulat yang tembus cahaya bervolume  $\pm 25$  L. Setiap wadah dilengkapi dengan aerasi kuat untuk mengaduk nutrisi. Penggantian media dilakukan setiap minggu dengan masa pemeliharaan 6 minggu. Penimbangan bobot fragmen talus per wadah dilakukan tiap minggu, sedangkan pengukuran panjang dan penghitungan jumlah tunas pada fragmen talus dilakukan di akhir pengamatan. Parameter lingkungan yang dipantau setiap hari adalah suhu, salinitas dan intensitas cahaya.



Gambar 1. Berbagai macam pertumbuhan tunas pada fragmen talus

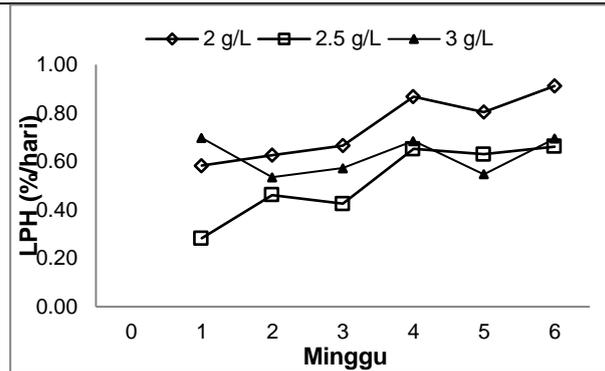
Pada percobaan pertama, hasil pengamatan menunjukkan bahwa laju pertumbuhan harian (LPH) bibit dengan kepadatan 2 g/L cenderung lebih tinggi daripada dua kepadatan lainnya (Gambar 2). LPH akhir tertinggi terjadi pada kepadatan 2 g/L yaitu 0,91%/hari dan terendah terjadi pada kepadatan fragmen talus 2,5 g/L yaitu 0,66%/hari. LPH pada kepadatan 2 g/L ini berbeda nyata dibandingkan dua kepadatan lainnya ( $P < 0,05$ ) (Gambar 3A). Sejalan

Fragment talus kemudian diaklimatisasi di perairan Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan menggunakan kotak hapa berbentuk kubus dengan panjang sisi 50 cm. Fragment talus diikat pada tali bentangan berdiameter 1,5 mm. Tali rumpun dibuat dari talia rafia. Jarak antar tali rumpun adalah 10 cm yang memuat 5 tali rumpun. Jumlah fragmen talus yang diikat pada tali rumpun 10 fragmen talus. Tali bentangan sebanyak 20 tali diikat dalam kotak hapa. Kotak hapa diberi pelampung dan diletakkan di laut. Pertumbuhan diamati setiap bulan selama 2 bulan masa pemeliharaan. Sampel air diambil untuk mengukur kandungan fosfat ( $PO_4$ ), amonia ( $NH_4$ ) nitrat ( $NO_3$ ) dan Bahan Organik Terlarut (BOT).

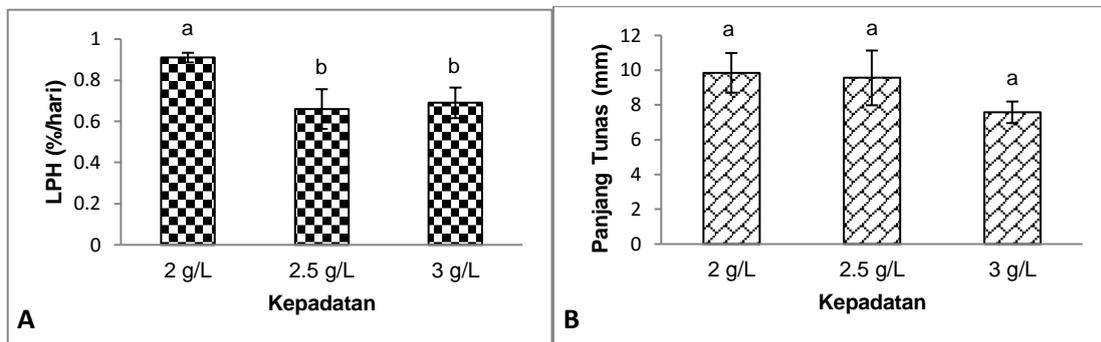
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap pertumbuhan tunas pada propagasi *ex vitro* memperlihatkan tunas ada yang tumbuh hanya di ujung fragmen talus (terminal) atau hanya di samping fragmen talus (lateral) atau di ujung dan samping fragmen talus (terminal dan lateral) (Gambar 1). Perbanyakan bibit yang terjadi di proses ini adalah melalui regenerasi langsung. Talus-talus baru yang muncul dan tumbuh merupakan tunas yang terdiferensiasi. Menurut Yong *et al.* (2014), perbanyakan bibit melalui regenerasi langsung lebih disukai daripada regenerasi tidak langsung. Dengan melakukan regenerasi langsung maka variasi somaklonal dapat diminimalkan.

dengan hal tersebut, pengukuran panjang tunas tertinggi juga terjadi pada kepadatan 2 g/L yaitu 9,85 mm dan terendah terjadi pada kepadatan 3 g/L yaitu 7,57 mm. Namun demikian panjang tunas pada tiga kepadatan tersebut berbeda tidak nyata ( $P > 0,05$ ) (Gambar 3B). Begitu pula jumlah tunas per fragmen talus pada tiga kepadatan menunjukkan tidak ada perbedaan yaitu rata-rata 5 tunas per fragmen talus.



Gambar 2. Laju Pertumbuhan Harian (LPH) bibit rumput laut pada kepadatan fragmen talus berbeda selama 6 minggu propagasi *ex vitro*



Gambar 3. Laju Pertumbuhan Harian (A) dan panjang tunas (B) fragmen talus rumput laut *Gracilaria* sp. pada kepadatan berbeda setelah 6 minggu propagasi *ex vitro*

Secara umum, kondisi pertumbuhan fragmen talus setiap minggunya mengalami fluktuasi (Gambar 2). Kondisi ini disebabkan karena fluktuasi lingkungan sekitar. Suhu dan intensitas cahaya di dalam laboratorium Aklimatisasi mengikuti kondisi lingkungan di luarnya. Intensitas cahaya yang cukup tinggi dan suhu di siang hari dapat mencapai  $>30^{\circ}\text{C}$  sehingga meningkatkan pertumbuhan epifit. Berdasarkan pengamatan, epifit ini berupa sejenis alga hijau yang menempel kuat di fragmen talus rumput laut. Fragmen talus yang terinfeksi epifit ini kemudian disisihkan karena dapat menginfeksi fragmen yang lain.

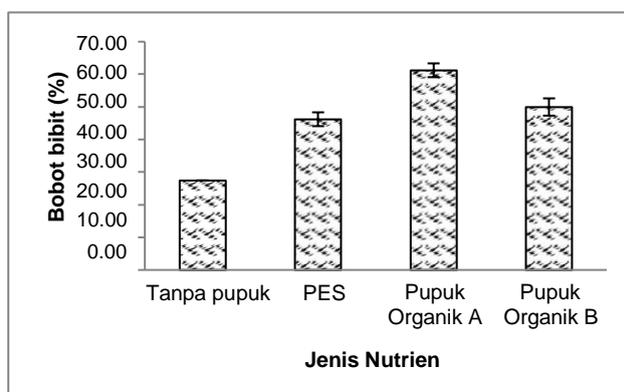
Berdasarkan hasil penelitian tersebut, tampak bahwa kepadatan fragmen talus berbanding terbalik dengan pertumbuhan bibit. Kepadatan terendah memiliki pertumbuhan tertinggi. Hal ini disebabkan, dengan jumlah nutrisi yang sama maka jumlah individu yang lebih sedikit dapat memanfaatkan lebih banyak nutrisi dibandingkan jumlah individu yang lebih banyak. Kepadatan yang lebih tinggi juga memberikan efek penumpukan antar fragmen talus yang lebih besar dibandingkan kepadatan yang lebih rendah. Penumpukan ini menyebabkan beberapa fragmen talus terhalangi untuk mendapat cahaya melakukan fotosintesis.

Menurut Yong *et al.* (2014) kepadatan berdampak negatif terhadap sintasan, pertumbuhan, dan reproduksi suatu individu tanaman. Sumber daya yang sama, seperti cahaya, nutrisi, dan ruang harus diperebutkan antara tanaman kecil dan besar sehingga terjadi kompetisi asimetris. Selain itu, peningkatan kepadatan dapat menyebabkan penetrasi cahaya berkurang karena ada efek peneduhan antar tanaman sehingga mempengaruhi fotosintesis. Peningkatan kepadatan juga dapat mengurangi pergerakan air dalam media sehingga beberapa tanaman mungkin tidak mendapat cukup nutrisi.

Pada percobaan kedua, penambahan nutrisi eksogen didasari bahwa rumput laut mutlak membutuhkan tambahan nutrisi dalam pemeliharaan terkontrol. Hal ini terbukti pada hasil pengamatan yang menunjukkan bahwa penambahan nutrisi lebih memperbaiki pertumbuhan fragmen talus dibandingkan tanpa pupuk (Gambar 5). Persentase bobot fragmen talus cenderung lebih baik dalam media dengan penambahan enis pupuk organik A (61,25%) dibandingkan dengan pupuk PES dan pupuk organik B setelah 6 minggu pemeliharaan. Hasil yang berbeda antar jenis pupuk ini disebabkan masing-masing pupuk memiliki komposisi dan

konsentrasi nutrisi yang berbeda. Hasil ini didukung oleh hasil penelitian Alamsjah *et al.*, (2009) yang menyatakan konsentrasi kombinasi pupuk NPK dan TSP (50%:50%) memberi pertumbuhan terbaik pada *Gracilaria*

*verrucosa*. Selanjutnya hasil penelitian Ginting *et al.* (2015) menyatakan dosis pupuk organik 3,5 ml memberi laju pertumbuhan terbaik pada *Caulerpa lentillifera*.

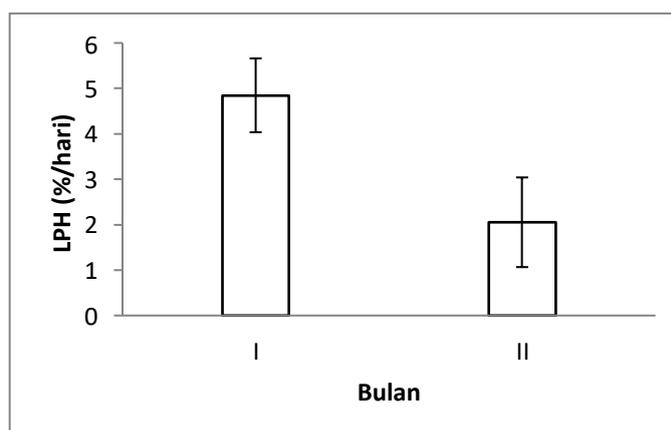


Gambar 5. Bobot fragmen talus rumput laut *Gracilaria sp.* pada jenis nutrisi berbeda

Pengamatan secara morfologi memperlihatkan bibit *Gracilaria sp.* yang diaklimatisasi berwarna hijau gelap, segar, dan pertumbuhan talus lebih cenderung ke arah memanjang daripada menumbuhkan cabang-cabang tunas ke samping. Pertumbuhan bibit bervariasi, ada talus yang pendek dengan sedikit percabangan dan ada pula yang dapat mencapai panjang sekitar 30 cm. Penempatan kotak hapa saat aklimatisasi di laut tampak berpengaruh terhadap pertumbuhan bibit. Kotak hapa yang berada di kedua ujung memperlihatkan pertumbuhan bibit yang lebih baik dibandingkan kotak hapa yang berada di

tengah. Diduga pergerakan air laut terjadi lebih banyak di ujung daripada di tengah sehingga memungkinkan penyerapan nutrisi lebih tinggi pada bibit dan pertumbuhannya meningkat.

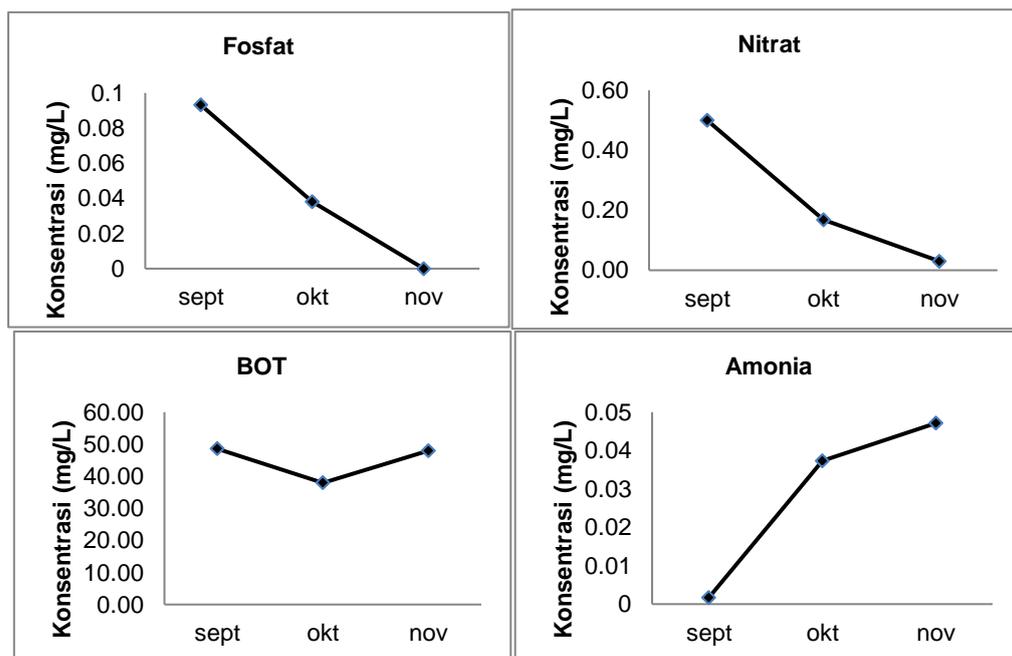
Bulan pertama aklimatisasi, LPH bibit *Gracilaria sp.* meningkat pesat berkisar antara 3,38-5,76 %/hari, dengan rata-rata LPH adalah 4,85 %/hari. Selanjutnya di bulan kedua, LPH menurun berkisar antara -0,41-2,98 %/hari, dengan rata-rata LPH adalah 2,05 %/hari (Gambar 6). Fluktuasi LPH ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan perairan.



Gambar 6. Laju pertumbuhan harian bibit (LPH) bibit selama aklimatisasi di perairan Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan.

Kecenderungan penurunan LPH bibit selama aklimatisasi didukung oleh kecenderungan penurunan kandungan fosfat dan nitrat perairan di lokasi pengamatan (Gambar 7). Kandungan fosfat dan nitrat bahkan nilainya mendekati 0 mg/L di bulan November. Sementara BOT berada di kisaran 40- 50

mg/L dan amonia 0,03-0,04 mg/L. Menurut Kamalasi (2008), kisaran nitrat yang sesuai untuk pertumbuhan rumput laut adalah antara 0,01-1,00 mg/L dan fosfat 0,10-0,30 mg/L. Amonia untuk biota laut 0,3 mg/L (Menlh, 2004)



Gambar 7. Kualitas air selama aklimatisasi di perairan Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan

#### KESIMPULAN DAN SARAN

Laju pertumbuhan dan panjang tunas terbaik terjadi pada kepadatan 2 g/L, namun jumlah tunas per fragmen menunjukkan tidak ada perbedaan yaitu rata-rata 5 tunas per fragmen. LPH tertinggi bibit saat aklimatisasi mencapai 4,85 %/hari pada bulan pertama, kemudian menurun menjadi 2,05 %/hari di bulan kedua. Propagasi *ex vitro* dapat dijadikan salah satu upaya alternatif perbanyak bibit pada *Gracilaria sp.* dengan memperhatikan beberapa kondisi fisik pemeliharaan, terutama suhu dan intensitas cahaya.

#### DAFTAR PUSTAKA

Akin-idowu, P.E., Ibitoye, D. O., & Ademoyegun, O. T. (2009). Tissue Culture As A Plant Production Technique for Horticultural Crops. *African Journal of Biotechnology*, 8(16), 3782-3788.

Alamsjah, M.A., Tjahjaningsih W., & Pratiwi A.W. (2009). Pengaruh Kombinasi Pupuk NPK dan TSP Terhadap Pertumbuhan, Kadar Air dan Klorofil a *Gracilaria verrucosa*. *Jurnal ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 1(1), 103-116.

Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Vasquez, N., & Etienne, H. (2002). Comparison of Somatic Embryogenesis-derived Coffee (*Coffea arabica L.*) Plantlets Regenerated In Vitro or Ex Vitro:

Morphological, Mineral and Water Characteristics. *Annals of botany*, 90(1), 77-85.

Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of Tissue Cultured Plantlets: From Laboratory to Land. *Biotechnology letters*, 32(9), 1199-1205.

Ginting, E. S., Rejeki, S., & Susilowati, T. (2015). Pengaruh Perendaman Pupuk Organik Cair Dengan Dosis yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan Rumput Laut (*Caulerpa lentillifera*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 4(4), 82-87.

Hurtado, A.Q., & Cheney, D.P. (2003). Propagule production of *Eucaema denticulatum* (Burman) Collins et Harvey by Tissue Culture. *Bot Mar*. 46: 338-341.

Jose, B., Satheeshkumar, K., & Seeni, S. (2007). A Protocol for High Frequency Regeneration Through Nodal Explant Cultures and Ex Vitro Rooting of *Plumbago rosea L.* *Pak J Biol Sci*, 10, 349-355.

Kamlasi, Y. (2008). Kajian Ekologis dan Biologi untuk Pengembangan Budidaya Rumput Laut (*Eucaema cottonii*) di Kecamatan Kupang Barat Kabupaten Kupang propinsi Nusa Tenggara Timur. Tesis Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor,

- Menlh. (2004). Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup No: 51 Tahun 2004 tentang Baku Mutu Air Laut. Deputi Menteri Lingkungan Hidup: Bidang Kebijakan dan Kelembagaan LH. Jakarta.
- Mohammed, A., Chiruvella, K. K., Namsa, N. D., & Ghanta, R. G. (2015). An Efficient In Vitro Shoot Regeneration from Leaf Petiolar Explants and Ex Vitro Rooting of *Bixa orellana* L.- A Dye Yielding Plant. *Physiology and molecular biology of plants*, 21(3), 417-424.
- Mulyaningrum, S. R. H., Daud, R., & Badraeni, B. (2014). Propagasi Vegetatif Rumput laut *Gracilaria* sp. melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Riset Akuakultur*, 9(2), 203-214.
- Posposilova, J., Ticha, I., Kadlecek, P., Haisel, D., & Plzakova, S. (1999). Acclimatization of Micropropagated Plants to Ex Vitro Conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4), 481-497.
- Ranaweera, K. K., Gunasekara, M. T. K., & Eeswara, J. P. (2013). Ex Vitro Rooting: A Low Cost Micropropagation Technique for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids. *Scientia Horticulturae*, 155, 8-14.
- Shekhawat, M. S., Kannan, N., Manokari, M., & Ravindran, C. P. (2015). In Vitro Regeneration of Shoots and Ex Vitro Rooting of An Important Medicinal Plant *Passiflora foetida* L. through Nodal Segment Cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 209-214.
- Yong, W. T. L., Ting, S. H., Yong, Y. S., Thien, V. Y., Wong, S. H., Chin, W. L., Rodrigues, K. F., & Anton, A. (2014). Optimization of Culture Conditions for the Direct Regeneration of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1597-1606.