

## Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Effect on Mutagenesis in Balinese Red Rice (*Oryza sativa* cv. Barak Cenana)

Ida Bagus Made Arta Dana<sup>1\*</sup>, Popy Hartatie Hardjo<sup>1</sup>, Maria Goretti Marianti Purwanto<sup>1</sup>, Aloysia Sri Pujiyanti<sup>1</sup>, Indriyani<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Faculty of Biotechnology, University of Surabaya, Surabaya Jalan Raya Kalirungkut, Surabaya 60292, East Java, Indonesia

### Article History

Received : July 18<sup>th</sup>, 2021

Revised : August 25<sup>th</sup>, 2021

Accepted : September 05<sup>th</sup>, 2021

Published : September 15<sup>th</sup>, 2021

\*Corresponding Author:

**Ida Bagus Made Artadana**,  
Fakultas Teknobiologi,  
Universitas Surabaya, Indonesia  
Email: arta@staff.ubaya.ac.id

**Abstract:** “Barak Cenana” is one of the local red rice (*Oryza sativa*) with high economic value due to its nutrient content. Some of the agronomic characters such as tall shoot, low number of tiller, and late harvesting are drawbacks to improving production. Ethyl Methyl Sulphonate (EMS) is a chemical mutagen widely used to improve rice characters by mutation breeding. The present research aims to investigate the EMS concentration suitable to induce mutation in Barak Cenana and observe the mutagenesis effect of EMS on some agronomic characters of Barak Cenana. For those purposes, mature seeds of Barak Cenana were treated with various concentrations of EMS (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, and 1.1 %) for 24 hours. Seed germination, plant growth, some agronomic character related to productivity were compared to untreated rice. EMS reduced and delayed seed germination and inhibit shoot and root growth in early vegetative stage. The ability of EMS to reduce and delay seed germination and inhibit shoot and root growth were doses dependent. EMS concentration of more than 1.0% was lethal for Barak cenana and EMS concentration at 0.75% was able to reduce rice productivity by increasing seed sterility. EMS concentrations between 0.25 and 0.5% with 24 h of soaking are suitable for inducing mutagenesis in Barak Cenana. Additionally, some mutants with distinct morphology such as sterile plant, semi-dwarf, high tillering capacity, and high chlorophyll contents were produced in this research.

**Keywords:** EMS; Mutagenesis; Agronomic; Germination; Productivity

### Pendahuluan

Barak cenana adalah salah satu jenis padi lokal dari Kabupaten Tabanan-Bali (Widarta *et al.*, 2013). Sampai saat ini, petani masih tetap menanam Barak Cenana secara turun-temurun karena memiliki harga yang tinggi yang disebabkan oleh tingginya kandungan nutrisi pada beras yang dihasilkan (Darmiati *et al.*, 2019). Indrasari (2011) melaporkan bahwa Barak Cenana kaya vitamin B dan antioksidan dalam bentuk antosianin. Namun demikian, jenis padi Barak Cenana memiliki usia yang panjang (180-190 hari) dan batang yang tinggi (> 170 cm) sehingga

berdampak pada produktivitasnya (Wiryatama, 2007). Padi dengan batang tinggi rentan rebah ketika memasuki fase reproduksi dan berakibat pada hilangnya gabah yang dapat di panen (Mackill *et al.*, 1996). Sementara itu, usia tanaman yang panjang mengakibatkan padi jenis Barak Cenana hanya mampu di tanam sekali dalam setahun (Subagyo, 2012).

Mutasi telah lama di manfaatkan untuk pemuliaan tanaman pangan (Oladosu *et al.*, 2016; Chaudhary *et al.*, 2019). Mutagen kimia atau fisika dapat mengubah susunan genom organisme sehingga dapat merubah sifat-sifat organisme tersebut (FAO, 2011: Viana *et al.*, 2019).. Pada tanaman padi, mutasi telah berhasil

dimanfaatkan untuk mengurangi tinggi tanaman (Phanchaisri *et al.*, 2017; Boonrueng *et al.*, 2013) dan usia tanam (Singh *et al.*, 2000), dan meningkatkan ketahanannya terhadap cekaman garam (Artadana *et al.*, 2014; Theerawitaya *et al.*, 2012).

Etil metil sulfonate (EMS) adalah salah satu mutagen kimia yang banyak dipergunakan untuk pemuliaan tanaman padi. EMS memicu terjadinya mutasi berupa perubahan pasangan basa DNA dari C/G menjadi A/T (Ramchader *et al.*, 2014; Viana *et al.*, 2019). Mutasi *missense* atau *nonsense* yang dipicu oleh EMS dapat mengubah struktur dan fungsi protein sehingga mengakibatkan perubahan pada satu atau beberapa sifat tanaman. Secara umum, konsentrasi EMS yang dipergunakan untuk memutasi tanaman padi berkisar antara 0.1% to 2 (Veni and Niveditha, 2014; Mohapatra *et al.*, 2014; Wattoo *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi EMS yang tepat untuk menginduksi mutasi dan pengaruhnya terhadap perubahan fenotip dari padi Barak Cenana.

## Bahan dan Metode

### EMS mutagenesis

Biji Barak Cenana diperoleh dari petani di desa Jatiluwih, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan-Bali. Mutasi dilakukan berdasarkan metode yang dijelaskan pada Ramchander *et al.* (2014) dengan sedikit modifikasi. Gabah dikupas dengan tangan dan kemudian beras direndam pada larutan EMS dengan kadar 0%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, atau 1,1% (w/v) selama 24 jam. Biji kemudian dicuci sebanyak tiga kali dengan air destilasi masing-masing selama 3 menit dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan air destilasi sebanyak 4 kali masing-masing selama 15 menit. Biji-biji tersebut dikecambahkan di dalam petri yang mengandung kertas saring basah. Tujuh hari setelah perkecambahan, semua bibit dipindahkan ke dalam pot berisi tanah dengan campuran tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 sampai masa panen.

### Karakterisasi pasi hasil mutasi

Pengamatan dilakukan pada fase perkembangan dan beberapa karakter morfologi selama masa vegetatif dan reproduktif.

Pengukuran tinggi tanaman dilakukan pada fase vegetatif dan reproduktif. Pada fase vegetatif, tinggi diukur dari pangkal batang sampai daun tertinggi sedangkan pada fase generatif tinggi diukur dari pangkat batang sampai ujung malai tangkai utama. Beberapa karakter agronomik diukur pada usia panen antara lain jumlah dan karakteristik malai, jumlah gabah per tanaman, persentase gabah isi dan berat 100 biji.

Uji viabilitas polen dilakukan pada malai steril (malai tanpa biji) berdasarkan metode yang dipaparkan oleh Waheed *et al.* (2013). Polen di ambil pada saat antesis dan diwarnai menggunakan larutan I<sub>2</sub>KI 1%.

### Uji statistik

Semua data dianalisis menggunakan uji *one-way analysis of variance* (ANOVA) at  $\alpha = 5\%$  menggunakan program SPSS. Adanya perbedaan antar perlakuan dianalisa menggunakan metoda *Duncan Multiply Range Test* (DMRT) pada tingkat kepercayaan 5%.

## Hasil dan Pembahasan

### Pengaruh konsentrasi EMS terhadap perkecambahan

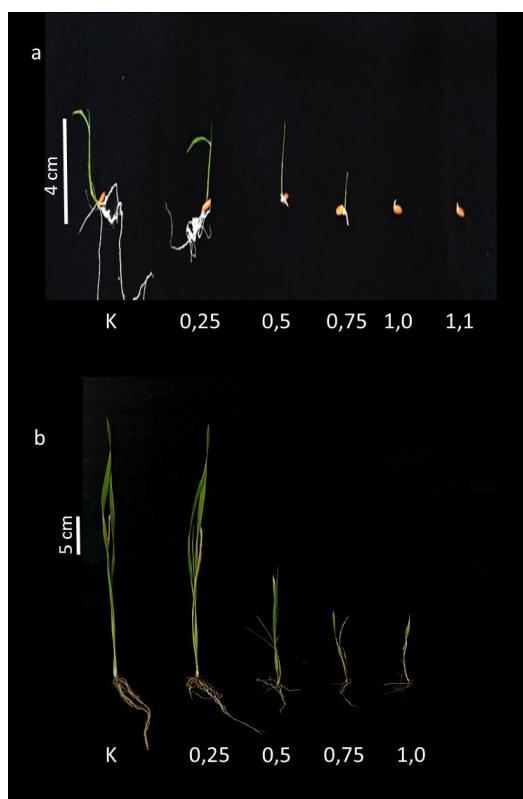
Perendaman dengan EMS mengakibatkan terhambatnya perkecambahan pada biji padi Barak Cenana. Persentase biji yang berkecambah menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi EMS (Tabel 1 and Gambar 1A). Perkecambahan mengalami penurunan signifikan ketika diberi perlakuan EMS dengan konsentrasi  $\geq 0.75\%$  dan mencapai LD 50 pada konsentrasi EMS 1, 10%.

Biji yang direndam dengan EMS menunjukkan adanya penundaan perkecambahan. Perendaman biji pada larutan EMS dengan konsentrasi 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 dan 1,10% secara berturut-turut mengakibatkan biji berkecambah 1, 2, 3, 4 dan 5 hari lebih lama dibandingkan kontrol (Tabel 1).

Table 1 Persentase dan waktu perkecambahan dari padi Barak cenana yang diberi perlakuan EMS dengan berbagai konsentrasi

Konsentrasi EMS (%)	Perkecambahan (%)	Waktu perkecambahan (hari setelah perlakuan)
0,00	100,00±0,00 <sup>a</sup> (40/40)	1,50±0,57 <sup>a</sup>
0,25	97,50±0,050 <sup>a</sup> (39/40)	2,50±0,57 <sup>b</sup>
0,50	87,50±0,05 <sup>ab</sup> (35/40)	4,00±0,00 <sup>c</sup>
0,75	72,50±0,05 <sup>b</sup> (29/40)	5,00±0,00 <sup>d</sup>
1,00	67,50±0,95 <sup>bc</sup> (27/40)	6,00±0,00 <sup>e</sup>
1,10	50,0±0,18 <sup>c</sup> (20/40)	7,00±0,00 <sup>f</sup>

Keterangan: Huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) setelah dianalisa dengan *Duncan Multiple Range Test* pada  $\alpha = 5\%$ .

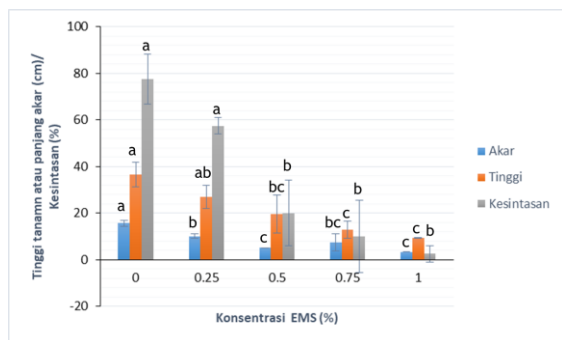


Gambar 1. Pengaruh EMS terhadap pertumbuhan akar dan tinggi padi Barak cenana. A. awal fase vegetatif; B. 30 hari setelah perkecambahan.

### Pengaruh EMS pada fase vegetatif

EMS menurunkan tinggi dan panjang akar pada fase vegetatif awal. Tujuh hari setelah perendaman dengan EMS, akar menunjukkan pertumbuhan yang lambat terutama pada padi yang mendapat perlakuan EMS dengan konsentrasi di atas 0,25%. Bahkan pertumbuhan akar tidak teramati pada tanaman yang mendapat perlakuan 1% dan 1,1% EMS (Gambar 2a). Sama seperti pertumbuhan akar, EMS dengan kadar di atas 0,25% juga terlihat menurunkan tinggi tanaman. Pengaruh EMS terhadap pertumbuhan akar dan tinggi tanaman masih teramati sampai padi berusia 30 hari setelah perkecambahan. Padi yang mendapat perlakuan 0,25, 0,5, 0,75 dan 1 % EMS memiliki panjang akar 35,5%, 67,6%, 52,8%, and 78,5%, lebih pendek dari kontrol (Gambar 2). EMS dengan konsentrasi 0,25% tidak mengakibatkan penurunan tinggi tanaman, namun konsentrasi di atas itu mengakibatkan penurunan signifikan pada pertumbuhan pucuk. Padi yang mendapat perlakuan EMS dengan konsentrasi 0,50, 0,75 dan 1,00% memiliki tinggi 16,83, 64,6, dan 74,2% lebih rendah dari kontrol. Selain itu, EMS juga menyebabkan penurunan persentase kesintasan tanaman padi pada usia 30 hari setelah perkecambahan.

Variasi fenotip teramati pada padi yang tumbuh dari biji yang mendapat perlakuan EMS. Berdasarkan tinggi tanaman terdapat dua kelompok tanaman yaitu tanaman dengan batang tinggi dan tanaman dengan batang sedang, berdasarkan diameter batang terdapat padi dengan batang lebar dan ramping, berdasarkan waktu munculnya anakan terdapat padi dengan waktu muncul anakan cepat dan lambat, dan berdasarkan munculnya daun bendera juga terdapat tanaman dengan waktu munculnya daun bendera yang cepat dan lambat (Tabel 2).



Gambar 2. Pengaruh EMS terhadap tinggi tanaman, panjang akar dan kesintasan tanaman pada usia 30 hari setelah perkecambahan. Huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda secara signifikan pada  $p < 0,05$  setelah dianalisa menggunakan *Duncan Multiple Range Test* pada  $\alpha = 5\%$ .

Tabel 2. Variasi fenotip yang teramati pada padi yang tumbuh dari biji yang mendapat perlakuan EMS.

Fenotip	Klasifikasi	Rentang	Persentase mutan putatif
Tinggi	Tinggi	>140	94
	Sedang	120-140	6
	Pendek	<120	-
Jumlah Anakan	Banyak	>6	3
	Sedikit	<5	97
Diameter batang	Lebar	$\geq 1,0$	25
	Ramping	$\leq 0,9$	75
Waktu munculnya anakan	Cepat	<60	6
	Lambat	>61	94
Munculnya daun bendera	Cepat	$\leq 110$	25
	Lambat	>111	75

### Produktivitas padi yang diberi perlakuan EMS

Dari tiga parameter produktivitas yang diukur, hanya persentase gabah isi yang menunjukkan perbedaan signifikan (Tabel 3). Padi dengan perlakuan 0,75% EMS memiliki persentase gabah isi 55% lebih rendah dari kontrol.

Tabel 3. Pengaruh EMS terhadap produktivitas tanaman Padi

Konsentrasi EMS (%)	Jumlah gabah isi	Persentase gabah isi	Berat 1000 biji (g)
0,00	629 ± 230,638	60 ± 0,164 <sup>a</sup>	28,71 ± 1,399
0,25	463 ± 158,314	54 ± 0,295 <sup>ab</sup>	28,83 ± 1,406
0,50	555 ± 183,875	38 ± 0,448 <sup>ab</sup>	28,73 ± 1,685
0,75	414 ± 110,211	27 ± 0,255 <sup>b</sup>	27,89 ± 1,833

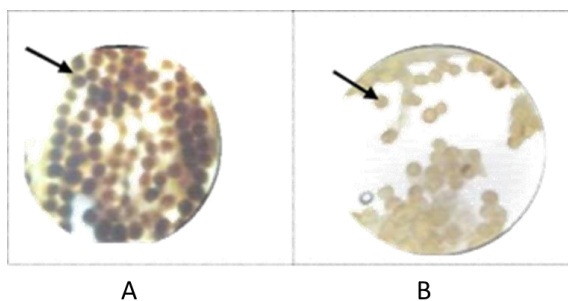
Keterangan: huruf yang sama pada table menunjukkan perbedaan signifikan pada  $p < 0,005$  setelah dianalisis dengan *Duncan Multiple Range Test* pada  $\alpha = 5\%$ .

### Mutan putatif dengan karakter unik

Lima muntan putatif dengan karakter unik teramati pada penelitian ini (Table 4). Tiga mutan putatif memiliki malai steril yang salah satunya disebabkan oleh gagalnya polen mengalami pematangan (Gambar 3). Salah satu dari ketiga mutan putatif steril memiliki tinggi kurang dari 140 cm. Mutan putatif 5A1.0 memiliki banyak anakan dan mutan putatif 3C0.5 memiliki kandungan klorofil yang tinggi di daunnya meski mengalami pertumbuhan yang lambat.

Tabel 4. Mutan putatif dengan karakter unik

Putatif mutan	Karakter unik
3A0.5	Malai steril, tinggi sedang (136 cm)
3D0.5	Malai steril
4A0.75	Mala steril
3C0.5	Pertumbuhan lambat dan kadar klorofil yang tinggi di daun.
5A1.0	Memproduksi banyak anakan



Gambar 3. Hasil uji viabilitas polen dari padi kontrol (A) dan mutan putative (B) dengan malai steril. Tanda panah menunjukkan polen.

### **Pengaruh EMS terhadap perkecambah**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kemampuan dari EMS dalam menghambat perkecambahan tergantung pada dosis yang diberikan. Persentase biji yang berkecambah menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi EMS. Hasil ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Ramchander *et al.* (2014) pada padi var White ponni and BPT 5204, Mohapatra *et al.* (2015) pada padi var. Nagina 22, Talebi *et al.* (2012) pada padi cv. MR219, Wattoo *et al.* (2013) pada padi Basmati, dan Ali *et al.* (2019) Dawk-Payawm dan Dawk Kha 50. Menurut Xuebao (1991), EMS menghambat respirasi pada biji, aktivitas sitokrom oksidase dan enzim amilase sehingga menyebabkan terhambatnya perkecambahan biji. Kondisi serupa diduga menjadi penyebab terhambatnya perkecambahan pada padi Barak cenana yang mendapat perlakuan EMS.

LD50 merupakan parameter yang penting dalam melakukan pemuliaan pada tanaman secara mutagenesis. Umumnya dosis yang dipakai untuk mutagenesis lebih rendah dari LD50. LD 50 dari padi barak cenana berada pada dosis EMS 1,1% dengan perendaman selama 24 jam. Nilai ini sama dengan LD 50 dari padi Basmati (Wattoo *et al.*, 2013) dan lebih tinggi dari padi and e cv MR219 (Talebi, 2012). Dengan mempertimbangkan persentase perkecambahan dan kesintasan, konsentrasi EMS yang dipergunakan pada mutagenesis padi barak cenana di masa depan ada dikisaran 0,25-0,5 %.

### **Pengaruh EMS terhadap pertumbuhan**

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pemberian EMS tidak hanya menghambat perkecambahan, melainkan juga pertumbuhan akar dan tinggi tanaman padi (Talebi *et al.*, 2012; Ramchander *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2019). Peristiwa yang sama juga teramati pada penelitian ini. Pertumbuhan tinggi dan akar menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi EMS yang diberikan. Fenomena ini diduga muncul akibat adanya gangguan fisiologi dan pembelahan sel yang timbul akibat pemberian EMS pada biji. Seperti telah dikemukakan sebelumnya, Xuebao (1991) menemukan bahwa EMS menyebabkan penurunan laju respirasi, aktivitas sitokrom oksidase, dan amilase pada bibit padi sehingga berdampak pada pertumbuhan tanaman padi.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi EMS yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan kromosom pada jaringan meristematis akar (Rani and Kumar, 2015; Verma *et al.*, 2012; Patil and Bhat, 1992). Pada cabai (*Capsicum annum* L.). Kerusakan kromosom yang diinduksi oleh EMS berkaitan erat dengan menurunnya laju pertumbuhan dan pembelahan mitosis pada akar (Devi and Mullainathan, 2011).

EMS merupakan mutagen kimia yang menyebabkan terjadinya mutasi berupa perubahan basa dari A/G menjadi C/T. Mutasi yang terjadi bersifat acak sehingga memicu terjadinya variasi genetik. Variasi genetik dapat terekspresi dalam bentuk variasi fisiologi, perkembangan ataupun morfologi (Viana *et al.*, 2019). Variasi morfologi pada tanaman padi yang mendapat perlakuan EMS juga ditemukan pada penelitian ini dalam bentuk variasi tinggi, waktu munculnya anakan dan bendera, diameter batang dan jumlah anakan. Adanya variasi tersebut mengindikasikan EMS yang diberikan kemungkinan menyebabkan mutasi pada padi Barak cenana. Untuk membuktikan hal tersebut, kedepan dapat dilakukan analisis secara molekuler menggunakan DNA *fingerprinting*.

### **Produktivitas padi**

Produktivitas padi ditentukan oleh berat beras yang dihasilkan. Berat beras yang dihasilkan pertanian sangat tergantung pada beberapa sifat agronomik seperti jumlah malai, jumlah gabah per malai, persentase gabah isi dan berat 1000 biji (Pandey and Anurag, 2010; Hairmansis *et al.*, 2010). Barak cenana yang dimutasi menggunakan 0,75% EMS menunjukkan adanya penurunan produktivitas yang disebabkan oleh penurunan persentase gabah isi. Salah satu penyebab rendahnya gabah isi adalah rendahnya viabilitas polen. Singh and Singh (2003) melaporkan bahwa padi Basmati yang ditreatmen dengan EMS kadar tinggi mengalami penurunan gabah isi yang disebabkan oleh rendahnya viabilitas polen.

### **Mutan putatif dengan karakter unik**

Pada penelitian saat ini, lima putatif mutan dengan karakter yang berbeda dari WT berhasil diperoleh, namun tidak satupun dari mutan tersebut memiliki produktivitas yang lebih tinggi dari WT. Meski demikian, semua putatif

mutan memiliki potensi untuk dipergunakan dalam meningkatkan produktivitas padi Barak Cenana dengan persilangan konvensional. Tiga putatif mutan memiliki malai steril yang disebabkan oleh hilangnya viabilitas polen. Jantan steril sangat penting dalam persilangan tanaman yang melakukan penyerbukan sendiri seperti padi (Virmani, 1994). Selain itu, mutan putatif 3A0.5 memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam menghasilkan padi Barak cenana dengan dengan pucuk yang lebih pendek. Padi dengan batang pendek tidak mudah patah sehingga dapat mencegah hilangnya gabah pada fase reproduksi (Yan *et al.*, 2012). Mutan putatif 5A1.0 berpotensi dipergunakan untuk meningkatkan produktivitas padi karena memiliki anakan dalam jumlah banyak. Jumlah anakan padi berkolerasi positif dengan jumlah malai dan gabah yang dihasilkan per tanaman (Khush, 2001; Xing and Zhang, 2010). Salah satu pendekatan fisiologis untuk meningkatkan produktivitas tumbuhan adalah dengan meningkatkan kemampuan menyerap cahaya untuk fotosintesis. Klorofil merupakan molekul yang bertanggung jawab dalam penyerapan energi cahaya dalam fotosintesis. Zang *et al.* (2012) melaporkan mutan dari padi Gc yang memiliki kandungan klorofil lebih tinggi dari WT juga memiliki laju fotosintesis yang lebih tinggi dari WT. Mutan putatif 3C0.5 memiliki kandungan klorofil yang lebih tinggi dari WT sehingga berpotensi dimanfaatkan untuk meningkatkan kapasitas fotosintesis dari Barak Cenana sehingga produktivitas dari padi ini meningkat. .

## Kesimpulan

Perendaman biji padi Barak cenana dengan konsentrasi 0,5% atau lebih selama 24 jam menurunkan persentase perkecambahan dan pertumbuhan pada awal fase vegetatif. Sedangkan konsentrasi 0,75% dapat menurunkan produktivitas padi. Untuk melakukan mutagenesis direkomendasikan pada padi barak cenana sebaiknya menggunakan dosis EMS 0,25-0,5% dengan perendaman selama 24 Jam.

## Ucapan terima kasih

Kami mengucapkan terimakasih atas Pendanaan yang diberikan oleh DIKTI dan

Facilities penelitian yang disediakan oleh Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya.

## Referensi

- Ali, A., C. Nualsri and W. Soonsuwon (2019). Induced mutagenesis for creating variability in Thailand's upland rice (cv. Dawk Pa-yawm and Dawk Kha 50) using ethyl methane sulphonate (EMS). *Sarhad Journal of Agriculture*, 35(1): 293-301. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2019/35.1.293.301>
- Artadana, I.B.M., Cha-um, S., & Supaibulwatana, K. (2014). Phenotypic responses of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML 105) and its mutants to sodium chloride stress. *Proceeding of 2ndAGRC*:66-71.
- Boonrueng, N., Anuntalabhochai, S., & Jampeetong, A. (2013). Morphological and Anatomical Assessment of KDML 105 (*Oryza sativa* L. spp. *Indica*) Rice and Its mutants Induced by Low-Energy Ion Beam. *Rice Science* 20(3):- . DOI: <https://doi.org/10.1016/S1672-6308>
- Chaudhary, J., Deshmukh, R., and Sonah, H. (2019). Mutagenesis Approaches and Their Role in Crop Improvement. *Plants* 8 (467): 1-4. DOI: 10.3390/plants8110467
- Darmiati, N. N., Sukmawati, N. M. S., & Siti, N. W. (2019). Pengolahan beras merah lokal penebel (*oryza sativa* var. barak cendana) menjadi produk teh beras merah untuk meningkatkan pendapatan masyarakat desa Babahan. *Buletin Udayana Mengabdikan* 18 (1): 22-27. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jum/article/view/46299>
- Devi A.S., & Mullainathan (2011). Genotoxicity of Ethyl Methane sulfonate on Root Tip of Chilli (*Capsicum annum* L.). *World Journal of Agricultural Science* 7 (4): 368-374 [http://www.idosi.org/wjas/wjas7\(4\)/1.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas7(4)/1.pdf)

- FAO (2011). *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. FAO, Rome. ISBN 9789251050000.
- Hairmansis A., Kustianto B., Supartopo & Suwarno (2010). Correlation of Agronomic Characters and Grain Yield of Rice for Tidal Swamp Areas. *Indonesia Journal of Agricultural Science* 11 (1): 11-15.  
<http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/ijas/article/view/592/373>
- Indrasari S. D. (2011). *Peneliti Gizi dan Makanan* 30:182–188.  
<http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/jpptp/article/view/3024>
- Khush, G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature review genetic* 2: 815-822
- Mackill, D. J., Coffman, W. R., and Garrity, D. P. (1996). Rainfed lowland rice improvement. IRRI, Manila. ISBN 971-22-0071-X. p53.
- Mohapatra, T., Robin, S., Sarla, N., Sheshashayee. M., Singh, A. K., Singh, K., Singh, N. K., Mithra, S. V. A., ... & Sharma, R. P. (2014). EMS Induced Mutants of Upland Rice Variety Nagina22: Generation and Characterization. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 80 (1); 163-172. DOI:10.16943/ptinsa/2014/v80i1/55094
- Oladosu, Y., Rafi, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A, Rahim, H. A., Miah, G., ... & Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology and biotechnological equipment*, 30 (1): 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>
- Patil, B.C. and Bhat, G. I. (1992). A comparative Study of MH and EMS in the Induction of Chromosomal Aberrations on Lateral oot Meristem in *Clitoria ternatea* L. *Cytologia*, 57: 259-264
- [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia1929/57/2/57\\_2\\_259/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia1929/57/2/57_2_259/_pdf)
- Pandey, P. and Anurag, P. J. (2010). Estimation of genetic parameters in indigenous rice. *AAB Bioflux*, 2 (1): 79-84  
[http://www.aab.bioflux.com.ro/docs/2010\\_2.79-84.pdf](http://www.aab.bioflux.com.ro/docs/2010_2.79-84.pdf)
- Phanchaisri, B., Chandet, Yu, L. D., Jamjod, S., & Anuntalabhochai, S. (2007). Low-energy ion beam-induced mutation in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105). *Surface & Coating technology*, 201: 8024-8028. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.02.057>
- Ramchander, S., Pillai, M. A., & Ushakumari, R. (2014). Determine of Lethal Dose and Effect of Ethyl Methane Sulphonate in Rice Varieties. *Trend in Bioscience*, 7(11): 1151-1156
- Rani, N. and Kumar, K. (2015). EMS induced mitotic abnormality in Chatharantus roseous (L.) G. Don. *Journal of Global Bioscience*. 4: 1816-1823.  
<https://www.mutagens.co.in/jgb/vol.04/1S/03.pdf>
- Singh, R. K., Singh, U. S., & Khush, G. S. (2000). *Aromatic rice*. New Delhi, Oxford & IBH Publishing. ISBN: 81-204-1420-9
- Singh, S. and Singh, J. (2003) Mutation in basmati rice induced by gamma rays, ethyl methane sulphonate and sodium azide. *Oryza*, 40 (1-2):5-10
- Subagyo, R. (2012). *Jatiluwih, Menjaga Warisan Beras Merah*.  
<https://bali.antaranews.com/berita/32328/jatiluwih-menjaga-warisan-beras-merah> (Accessed on February 4, 2015)
- Talebi, A. B., Talebi, A. B., & Shahrokhifar, B. (2012). Ethyl Methane Sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. *American Journal of Plant Sciences* 3:1661-1665. DOI:

- <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.312202>
- Theerawitaya, C., Triwitayakorn, K., Kirdmanee, C., Smith, D. R., & Supaibulwatana, K. (2011). Genetic variation associated with salt tolerance detected in mutants of KDML 105 (*Oryza sativa* L. spp. *Indica*) rice. *Australian Journal of Crop Science*, 5(11): 1475-1480
- Veni, B. K. and Niveditha, M. S. (2014). Effect of Mutagens on Quantitative and Qualitative Characters in M3 Generation of Rice Variety 'Akshaya' (BPT 2231). *Journal of Rice Research*, 7(1): 16-24. DOI: <http://sarr.co.in/Journals/2014/jrr-volume-7-3.pdf>
- Verma, A. K., Singh, R. R., & Singh, S. (2012). Cytogenetic effect of EMS on root meristem cell of *Chataranthus roseus* (L.) G. Don var. Nirmal. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 2 (1): 20-24.  
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.420.7913&rep=rep1&type=pdf>
- Viana, V. E., Pegoraro, C., Busanello, C., and de Oliveira, A. C. (2019). Mutagenesis in rice: The basis for breeding a new super rice. *Frontier in Plant Science*, 10: 1-28. DOI: 10.3389/fpls.2019.01326
- Virmani, S.S. (1994). *Heterosis and Hybrid Rice Breeding*. Springer Berlin Heidelberg
- Waheed, A., Ahmad, H., Abbasi, F., Hamid, F. S., Shah, A. H., Safi, F. A., & Ali, H. (2013). Pollen Sterility in wide crosses derivatives of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (3): 404-409.  
[https://www.researchgate.net/publication/273766424\\_Pollen\\_Sterility\\_in\\_wide\\_crosses\\_derivatives\\_of\\_rice\\_Oryza\\_sativa\\_L](https://www.researchgate.net/publication/273766424_Pollen_Sterility_in_wide_crosses_derivatives_of_rice_Oryza_sativa_L)
- Widarta, I. W. R., Novianitri, K. A., & Sari, L. P. I. P. (2013). Ekstraksi komponen bioaktif bekatul beras local dengan beberapa jenis pelarut. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 2(2): 75-79.
- Wiryatama, N.A., (2007). Barak Cenana. Date of registration 83/PVL/2007
- Wattoo, J. I. K. A, Shah, S. M., Shabir, G., Sabar, M., Naveed, S. A., Waheed, R., Samiullah, Muqaddasi, Q. H., ... & Arif, M. (2013). Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenic attempts to create genetic variability in Basmatirice. *African Journal of Water Conservation and Sustainability*, 1(3):45-48.  
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.685.2086&rep=rep1&type=pdf>
- Xing, Y. and Zhang, Q. (2010) Genetic and Molecular bases of Rice Yield. *The Annual Review of Plant Biology*, 61: 11.1-11.22  
DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112209
- Xuebao, L. (1991). Effect of EMS on the germinating seed of rice. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 9(3): 263-267  
<http://www.whzwxj.cn/EN/abstract/abstract474.shtml#>
- Yan, W., Hu, B., Zhang, Q., Jia, L., Jackson, A., Pan, X., Huang, B., Yan, Z., ... & Deren, C. (2012). Short and erect rice (ser) mutant from 'Khao Dawk Mali 105' improve plant architecture. *Plant Breeding*, 131: 282-285. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01943.x>
- Zang, G., Zou, H., & Wenwen, Y. (2012). Photosynthetic and physiological analysis of the rice high-chlorophyll mutant (Gc). *Plant Physiology and Biochemistry*, 60: 81-87. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.07.019