

**STUDI ANATOMI ENDOFITIK *Rafflesia patma* DI DALAM INANG
Tetrastigma sp.**

**Anatomical Study of the Endophytic *Rafflesia patma* Inside
the Host *Tetrastigma* sp.**

Sofi Mursidawati¹⁾ dan Sunaryo²⁾

¹⁾ Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI
Jl. Ir. H. Juanda 13, Bogor 16003, Indonesia

²⁾ Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Email : sofi_mdawati@yahoo.com

Abstract

As an endoparasite, growth and development of *Rafflesia* occurred inside the host tissue. This cryptic habit is one factor hindering our understanding on how the relationship of host-parasite began. The anatomical study on host-parasite tissue is the approached used in this study. Using infected root tissue of *Rafflesia patma*, anatomical figures depicting the early event of infection to perfect stage of a flower was derived. However, more study is still required to completely represent the whole life growth and development of *Rafflesia* during its early stage as endophyte.

Keywords: anatomy, endoparasite, endophyte, *Rafflesia patma*, *Tetrastigma* sp.

Abstrak

Salah satu faktor yang menyebabkan belum terungkapnya asal mula hubungan *Rafflesia* dan inangnya adalah karena pertumbuhan dan perkembangannya terjadi dalam jaringan tubuh inang. Dalam studi ini kronologi perkembangan *Rafflesia* dilakukan dengan pendekatan studi anatomi jaringan inang yang terinfeksi *Rafflesia patma*. Gambar-gambar anatomi *R. patma* memperlihatkan beberapa fase perkembangan infeksi, mulai dari yang paling awal hingga paling akhir berupa kuncup bunga yang sempurna. Namun studi yang lebih menyeluruh masih sangat diperlukan mengingat belum seluruh rangkaian gambar anatomi dalam tulisan ini mewakili gambaran pertumbuhan *Rafflesia* seutuhnya.

Kata kunci: anatomi, endofit, endoparasit, *Rafflesia patma*, *Tetrastigma* sp.

PENDAHULUAN

Salah satu masa paling kritis yang sangat menentukan hidup tidaknya calon bunga *Rafflesia* di alam adalah awal interaksi bijinya dengan tumbuhan inang. Kehidupan biologis *Rafflesia* di alam sangat kompleks dan mensyaratkan kondisi tumbuh yang sangat spesifik sehingga secara langsung mengakibatkan kelangkaannya. Sifat langka tumbuhan ini menyebabkan kesulitan untuk memperoleh material yang dapat digunakan sebagai bahan penelitian. Sedangkan dari segi teknis, untuk mengamati interaksi biji dan inang secara langsung sangat sulit karena ukuran bijinya yang sangat halus. Perkembangan dan pertumbuhan biji tumbuhan *Rafflesia* yang bersifat endofit (terjadi di dalam tubuh inang) sehingga sampai saat ini pertumbuhan dan perkembangan *Rafflesia* di alam masih belum terungkap.

Dalam penelitian ini akan dibahas tentang hubungan *R. patma* dengan inangnya melalui studi anatomi. Beberapa studi anatomi yang telah dilakukan selama ini hanya memperlihatkan struktur anatomi *Rafflesia* yang sudah mekar dan berkembang besar, tidak terlalu banyak informasi yang didapatkan selain kemunculannya yang seringkali tidak dapat diperkirakan dari batang atau akar inang. Ilustrasi yang ada tentang struktur anatomi batang *Tetrastigma* terinfeksi, digambar oleh Jusimin Duaneh (dalam Nais, 2001). Gambar inipun merupakan ilustrasi ulang dari Brown (1921).

Studi ini bertujuan untuk memahami pertumbuhan dan perkembangan *R. patma* yang bersifat endoparasit. Dalam studi ini tumbuhan *Tetrastigma* yang terinfeksi oleh *Rafflesia patma* merupakan material utama sampel.

Pertumbuhan dan perkembangan *R. patma* diamati secara anatomis mulai dari ukuran infeksi yang terkecil hingga yang terbesar yang berhasil dikoleksi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk pengamatan adalah akar *Tetrastigma* yang sudah terinfeksi *Rafflesia*. Sampel berupa berbagai ukuran/fase pertumbuhan 'knop' (kuncup bunga) *R. patma* yang diambil dari habitat *R. patma* di kawasan Cagar Alam Pangandaran. Sampel diambil dari tumbuhan inang yang terinfeksi *Rafflesia*. Untuk meminimalkan kerusakan yang terjadi, maka sampel tidak diambil dari *Rafflesia* yang tumbuh di batang tapi yang tumbuh di akar.

Metode

Metode yang digunakan untuk memperoleh gambar anatomi ini adalah metode parafin (Berlyn & Miksche, 1976). Untuk membuat preparat anatomi harus melalui beberapa tahapan, diawali dengan proses fiksasi, dehidrasi (meliputi alkoholisasi dan xylolisasi), infiltrasi pemblokkan, *embedding*, pengirisan dan pewarnaan.

- Fiksasi: material segar dimasukkan ke dalam larutan FAA setelah itu dimasukan kedalam *vacump pump* hingga udara dalam jaringan tersedot keluar.
- Dehidrasi: Larutan FAA dibuang kemudian diganti berturut-turut dengan alkohol 50%, 70%, 95%, alkohol absolut, alkohol : xylol (3:1), alkohol:xylol (1:1), alkohol:xylol (1:3),

- xylol absolut 2 kali. Lama perendaman dalam masing-masing larutan adalah selama 3 jam.
- Infiltrasi: Serbuk parafin sedikit-sedikit dimasukkan ke dalam botol sampel hingga jenuh dan botol ditempatkan pada suhu ruang dalam keadaan tertutup. Botol kemudian dibuka dan disimpan dalam oven bersuhu 60°C. Pada 3 jam pertama $\frac{1}{4}$ bagian dari larutan dibuang kemudian diisi parafin cair. Selang 3 jam kemudian $\frac{1}{2}$ bagian dibuang dan diganti sebanyak yang terbuang. Langkah selanjutnya $\frac{3}{4}$ bagian larutan dibuang diganti lagi sama banyak. Terakhir semua dibuang diganti dengan larutan baru dan didiamkan selama 3 jam.
 - *Embedding*: pada tahap ini larutan parafin dimasukkan ke dalam kotak kertas berukuran 2 x 4 cm. Material dimasukkan dengan pinset ke dalam kotak ini dengan posisi yang diinginkan. Setelah parafin mengeras dikeluarkan dari kotak.
 - Penempelan blok paraffin ke *holder*: Parafin berisi material ditempelkan pada blok kayu yang ukurannya sesuai dan didiamkan hingga melekat kuat. Parafin yang tidak diinginkan dibuang sesuai bentuk material.
 - Pengirisan: Material diiris dengan mikrotom dengan ketebalan 17–20 μ . Irisan dideretkan pada gelas objek (*object glass*) yang sudah diolesi *haupt adhesive* sehari sebelumnya. Terakhir ditetesi dengan Formalin 4% dan dikeringkan diatas *hot plate* dengan suhu 30–35°C dan didiamkan 1 malam.
 - Pewarnaan: pada tahap pewarnaan, gelas objek yang sudah kering direndam selama masing-masing 3 menit dalam larutan-larutan berikut. Xylol absolut I; xylol absolut II; xylol:alkohol 3:1; xylol:alkohol 1:1; xylol:alkohol 1:3; alkohol absolut; alkohol 95%; alkohol 70%; alkohol 50%; Safranin 2%;

alkohol 50%; alkohol 70%; alkohol 95%; alkohol absolut; fast green 1%; alkohol absolut I; alkohol absolut II; alkohol:xylol 3:1; alkohol:xylol 1:1; alkohol:xylol 1:3; xylol absolut I; xylol absolut II. Sebelum ditutup gelas penutup (*cover glass*), *slide* ditetesi dengan Entelan.

Untuk studi ini diperlukan banyak sampel endofitik parasit *R. patma* dalam berbagai fase. Namun demikian tidak semuanya memberikan informasi yang diinginkan. Banyak di antara sampel yang tampak mulus dari luar namun setelah diiris ditemukan cacat yang membuat hilangnya informasi yang diinginkan. Pemilihan sampel ditentukan berdasarkan bentuk dan ukuran inang yang diduga terinfeksi. Sedangkan dalam teknis pengerjaan preparat hingga siap diamati diperlukan banyak modifikasi baik pada pemotongan maupun pewarnaan sampel agar tidak ada bagian jaringan yang terbuang yang pada akhirnya akan membuat hilangnya satu informasi.

Dua preparat diantaranya sengaja tidak diberi pewarna (Gambar 2 A & B) karena dengan pewarnaan membuat jaringan terhalus di awal fase terjadinya kontak tidak tampak terlihat jelas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

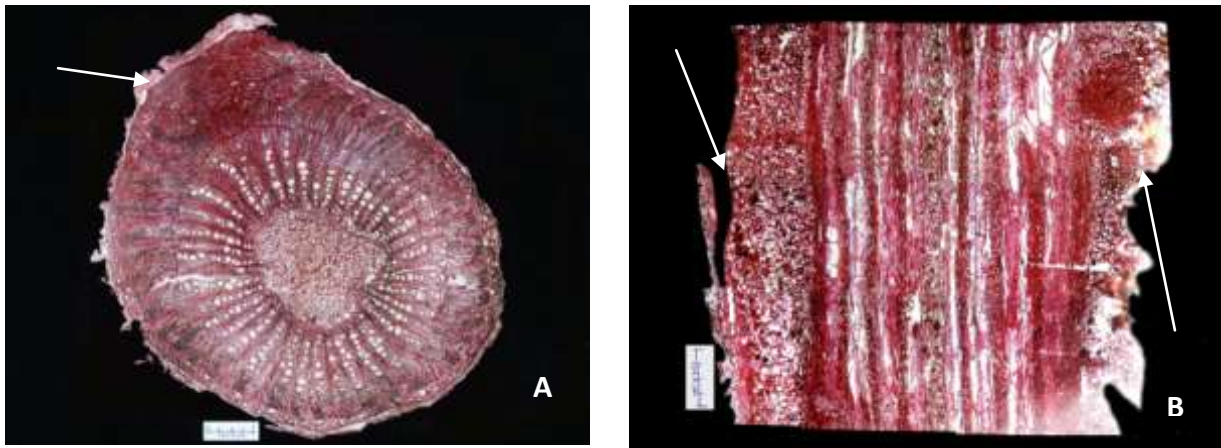
Meijer (1997) menyatakan bahwa fase vegetatif *Rafflesia* terjadi di dalam inang, sedangkan fase perkembangan generatif/bunga terjadi di luar inang. Awal fase generatif sebenarnya telah terjadi ketika bakal buah terbentuk di dalam inang. Fase vegetatif dan awal fase generatif *Rafflesia* sampai saat ini belum pernah ada yang mengamati secara teliti

karena sulitnya memperoleh material maupun teknis pendekatan pengamatannya.

Studi anatomi awal perkembangan dan pertumbuhan pada tumbuhan parasit lain seperti *Striga* dan *Santalum* relatif lebih mudah dikerjakan karena kecambahnya mudah diperoleh dan fase-fase perkembangan yang ingin diamati dapat dimonitor dalam kondisi terkontrol seperti dalam *pot culture* atau kultur *in vitro* (Tennakoon et al., 1997; Yoder, 1999). Pada *Rafflesia* yang hidup sebagai endoparasit pada *Tetrastigma* sp. dan hingga kini belum diketahui metoda kultur atau inokulasinya pada tumbuhan inang.

Dalam studi ini berhasil dikumpulkan beberapa bahan yang bisa memberi informasi awal perkembangan *R. patma* di alam. Bahan tanaman tersebut meliputi jaringan yang tidak terinfeksi maupun yang terinfeksi.

Jaringan inang yang normal dan tidak terinfeksi oleh *R. patma* memperlihatkan struktur yang beraturan. Pada potongan transversal (Gambar 1A) tampak jaringan xylem dengan posisi di tengah yang dikelilingi oleh floem yang tersusun melingkarinya. Potongan longitudinal (Gambar 1B) memperlihatkan jaringan pengangkut yang berjajar beraturan, jaringan gabus (panah) tampak melapisi permukaan luar akar.



Gambar 1. Potongan transversal (A) dan longitudinal (B) jaringan akar *Tetrastigma* (inang) tidak terinfeksi dengan perbesaran 40 x.

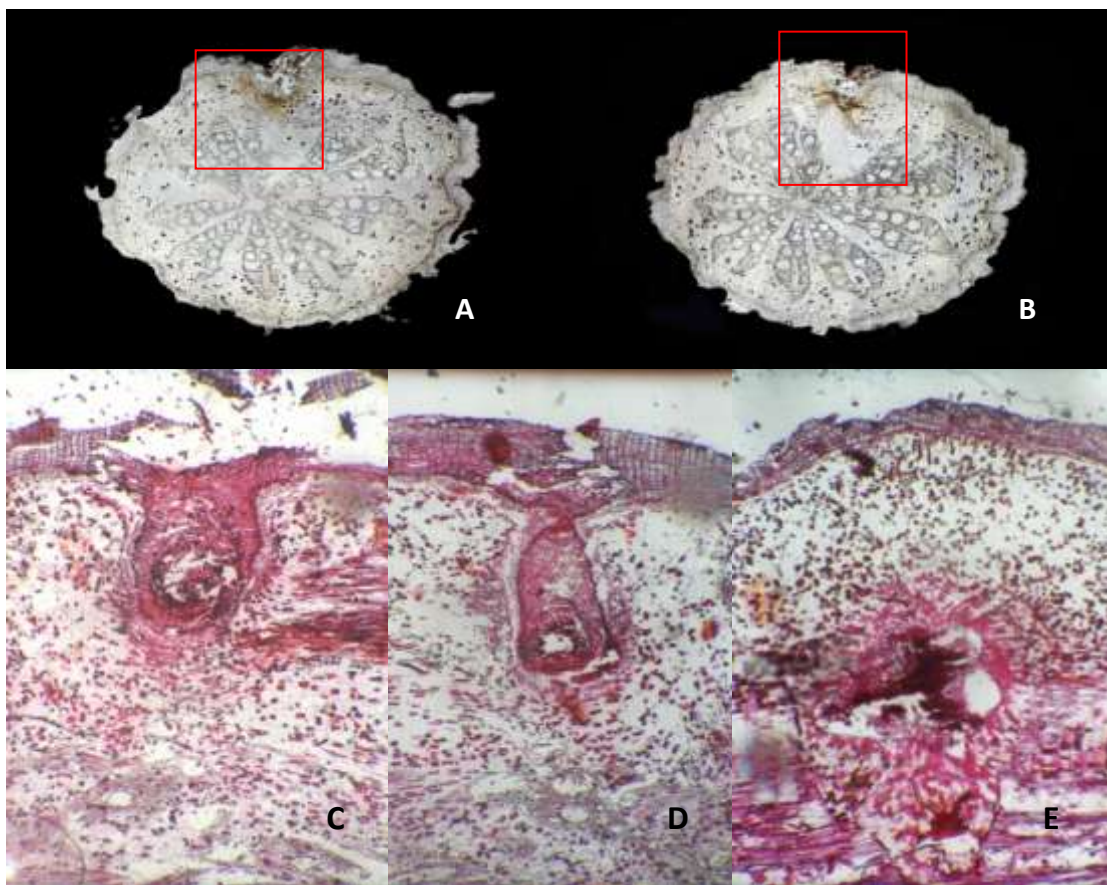
Secara morfologis sampel-sampel akar ini (Gambar 2 A-E) seperti halnya akar normal, tidak memperlihatkan adanya benjolan sebagai tanda telah terjadi terinfeksi. Jika dilihat dari luar, bagian terinfeksi hanyalah berupa area yang berwarna sedikit lebih tua daripada area sekitarnya. Di dalam larutan KI, bagian terinfeksi berwarna lebih gelap.

Gambar inang yang dipotong secara transversal (2A-B dalam kotak merah) memperlihatkan permukaan inang yang diinvasi oleh sel-sel berbentuk memanjang (filamen) seperti tidak berinti. Sel-sel tersebut terdesak masuk kedalam jaringan akar. Salah satu jaringan floem inang yang berada tepat di bawah titik invasi, mengalami desakan sehingga pertumbuhan jaringan tersebut agak tergeser ke arah samping.

Gambar 2 C-E adalah potongan longitudinal inang, secara morfologis akar tidak memperlihatkan tanda-tanda terinfeksi namun secara anatomis tampak adanya penyusupan jaringan asing yang padat (*massive*) dengan lubang di tengahnya (Gambar 2C). Kedalaman invasi jaringan asing tersebut posisinya dekat ke permukaan rhizodermis inang, sedangkan bagian

permukaan luar rhizodermis tampak mengalami kerusakan.

Jaringan inang yang sudah terinvasi oleh jaringan asing dalam fase lebih lanjut terlihat berada di posisi lebih dalam (Gambar 2B) dibandingkan pada Gambar 2A. namun tingkat kerusakan jaringan rhizodermisnya lebih ringan. Ada kemungkinan permukaan rhizodermis pulih sejalan dengan waktu.



Gambar 2. Potongan melintang jaringan akar *Tetrastigma* pada awal terjadinya invasi, perbesaran 40 x (A-B). Sedangkan gambar C-E adalah potongan longitudinal

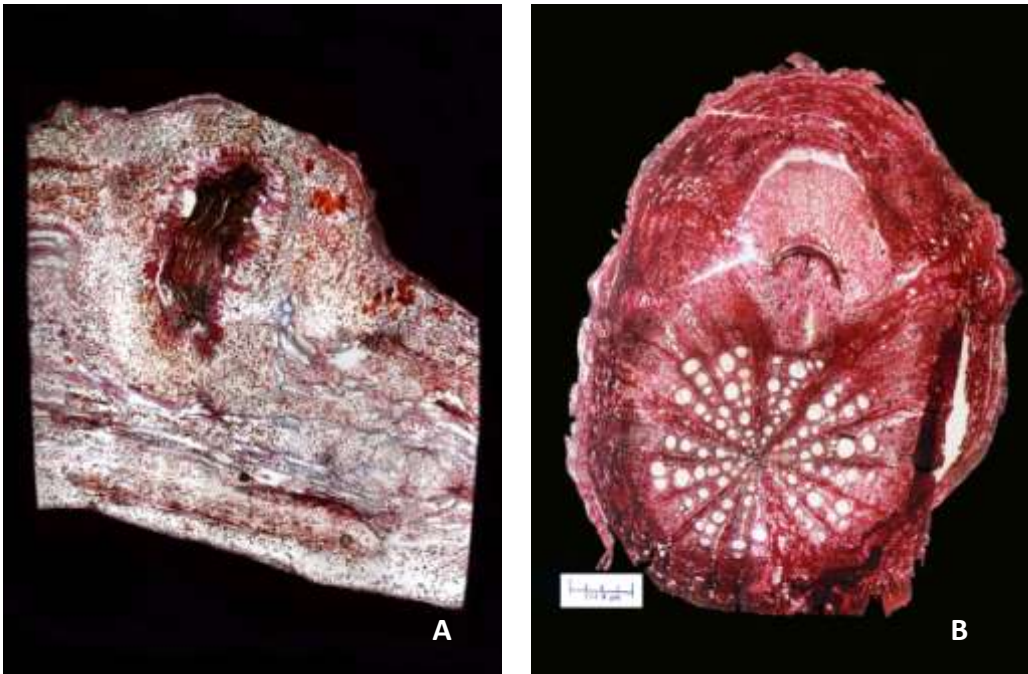
Fase pertumbuhan terlihat pada Gambar 2E, yang ditandai dengan proliferasi sel-sel parasit. Sel-sel tersebut berwarna lebih tua karena inti sel parasit lebih besar dari sel-sel

inang di sekelilingnya. Permukaan rhizodermis sama sekali tidak menunjukkan adanya kerusakan. Secara morfologis sampel kuncup ini sudah memperlihatkan penonjolan lemah

dengan diameter 0.4 mm. Di bagian bawah (jaringan pengangkut) tampak pembauran antara sel inang dan sel parasit.

Fase lebih lanjut terlihat pada Gambar 3A – B. yang secara morfologis sudah memperlihatkan tonjolan lebih tinggi (berdiameter 1 cm). Secara anatomis jaringan

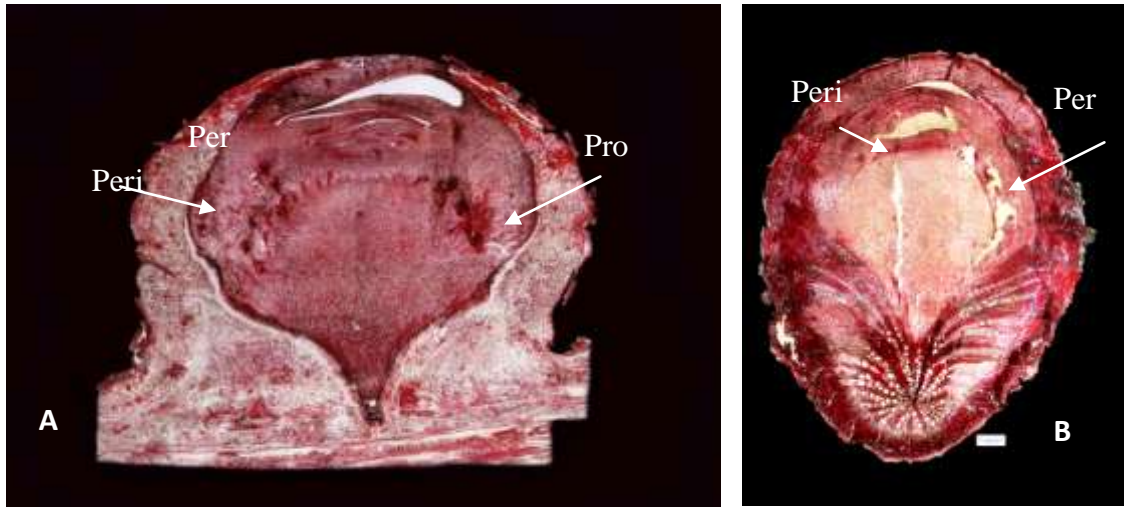
pengangkut inang pada potongan transversal tampak mengalami disorientasi pada bagian yang ditumbuhi parasit dan berangsur normal setelah jaringan parasit terlewati. Jaringan longitudinal dari akar yang berdiameter hampir sama memperlihatkan jaringan parasit yang berada di periderm/jaringan gabus.



Gambar 3. Potongan membujur dan melintang (A-B) akar dan kuncup *R. patma* (diameter akar 0,5 cm)

Gambar 4 adalah sampel kuncup berdiameter 1 cm. Tampak dalam gambar adalah jaringan inang yang sudah bisa dipastikan diinvasi oleh *R. patma*. Bagian-bagian yang terlihat mulai dari luar adalah :

- a. Jaringan epidermis inang yang terdiri dari jaringan keras berkayu/periderm (Peri), melingkupi seluruh bagian kuncup bunga.
- b. Calon perigone (Per) yang biasanya terdiri dari 5 helai tampak berlapis-lapis saling menumpuk satu sama lain.
- c. Calon processus (Pro) yang sudah terlihat berjajar mengelilingi bagian tengah bunga. Processus yang tampak menonjol dan bentuknya sudah sempurna.
- d. Bagian terbawah tempat menempelnya inang adalah jaringan pembuluh xylem dan phloem yang salah satu salurannya disadap oleh bunga parasit ini.



Gambar 4. Potongan membujur (A) dan melintang (B) dari kuncup *R. Patma*
peri = periderm ; per = calon perigone; pro = calon processus

Pada *Orobanche* differensiasi sel-sel parasit terakomodasi karena haustorinya membebaskan *pectin methyl esterase* untuk melarutkan sel inang (Ben-Hod *et al.*, 1993). Haustorium menurut Kuijt (1969) memiliki fungsi yang berbeda-beda sejalan dengan umurnya, konsekuensinya strukturnya pun menjadi berbeda di setiap fase. Yang terjadi pada *Rafflesia* berbeda dengan kelompok lain yang bersifat non endoparasit (kelompok *Loranthaceae*, *Viscaceae*, *Santalaceae*, *Cuscutaceae* dan lainnya), hal ini dijelaskan oleh Kuijt (1969), bahwa tumbuhan endoparasit melakukan seluruh mekanisme penyadapan di dalam jaringan tumbuhan inang.

Meijer (1997) menyatakan diperlukan waktu 9 bulan untuk biji hingga menjadi knop yang terlihat. Sedangkan Hidayati *et al.* (2001) memperkirakan 2 tahun dari biji sampai mencapai knop 2 cm bagi *R. patma* namun tidak dijelaskan dasar perkiraannya.

Proses penyembuhan luka/kerusakan pada batang *Cissus sycioides* di Miami (A.S) tergolong cepat (sekitar 6 jam) dan biasanya diikuti oleh pertumbuhan akar udaranya pada ujung proximalnya (Fisher & Ewers, 1991). Pada *Tetrastigma leucostaphyllum* sering pula dijumpai 'knop' *R. patma* yang ditumbuhi akar tipis langsing di permukaannya. Proses penyembuhan pada *T. leucostaphyllum* perlu dikaji lebih jauh apakah proses tersebut sejalan dengan proses perkembangan parasit di dalamnya. Dari pemotongan stek *Tetrastigma* sp. hingga menumbuhkan akar hanya memerlukan waktu 3 minggu (Data tidak dipublikasi).

Urutan fase seperti yang dijelaskan di atas adalah berdasarkan ukuran sampel yang berhasil didapatkan. Dari gambar-gambar yang diperoleh dapat dilihat bahwa ada beberapa fase perkembangan *Rafflesia* dalam awal interaksi dengan inangnya, seperti dijelaskan berikut ini :

Fase I

Gambar 1A-B mewakili salah satu tahap dalam proses penetrasi yang mengawali masuknya biji ke dalam tumbuhan inang. Gambar-gambar tersebut merupakan hasil irisan anatomi secara membujur dan melintang dari bagian akar tumbuhan inang (*Tetrastigma* sp.) yang secara morfologi tidak terdeteksi memiliki penonjolan sebagai tanda adanya infeksi.

Gambar 2 memperlihatkan permukaan yang mengalami sedikit penonjolan. Tepat dibawahnya secara anatomi terlihat adanya suatu badan atau materi asing yang seolah-olah terbenam di dalam suatu jaringan inang yang padat (*massive*). Posisi badan/materi tersebut sebagian masih berada pada permukaan atau dekat di bagian rizodermis akar tumbuhan inang. Gambaran anatomis mengindikasikan bahwa badan/materi tersebut mengadakan penetrasi lanjut sebagai awal dari proses invasi/penyusupan ke dalam jaringan tumbuhan inang. Indikasi itu dipertajam oleh adanya gambaran terjadinya perubahan-perubahan pada sel-sel jaringan tumbuhan inang yang berada disekitar badan/materi asing tersebut.

Perubahan-perubahan yang terjadi meliputi perubahan-perubahan pola, bentuk dan orientasi sel-sel jaringan inang. Perubahan-perubahan ini terjadi karena sel-sel mengalami desakan-desakan dan hambatan-hambatan akibat perkembangan dan invasi dari badan/materi asing tersebut. Akibat dari desakan dan hambatan-hambatan yang terjadi maka sel-sel jaringan tumbuhan inang di dalam pertumbuhannya banyak mengalami kesalahan-kesalahan orientasi.

Proses penetrasi juga mengakibatkan kerusakan pada jaringan rizodermis, yaitu

jaringan terluar pada akar tumbuhan inang. Pada perkembangan selanjutnya terlihat bahwa badan/materi asing tersebut tidak lain adalah jaringan yang terbentuk dari sel-sel yang berasal dari hasil deferensiasi biji *Rafflesia patma*. Sifat adhesif, intrusif dan fase konduktif dari haustoria ini terjadi susul menyusul dan *overlap*. Fase-fase tersebut dimanifestasikan dalam jaringan baru yang terbentuk untuk tujuan pelekatan pada permukaan inang. Hal ini seringkali terjadi pada haustoria spesialis intrusi yang akan menjadi pionir pembuka jalan masuk ke dalam inang dan akhirnya menjadi penghubung antara jaringan inang-parasit. Pada awal pembentukannya fungsi utama haustorium adalah penetrasi. Ini terjadi pada Santalaceae juga *Cassytha* dan *Cuscuta*. Namun tidak terlihat struktur khusus yang disebut haustoria pada Gambar 1 dan 2. Pada *Rafflesia* penyebutan haustoria, *absorptive system* atau *endophytic system* agaknya kurang tepat karena bagian yang disebut haustorium itu mungkin berupa seluruh tubuh vegetatifnya.

Fase II

Gambar 3 mewakili proses invasi, gambar ini merupakan hasil irisan anatomi secara membujur dari bagian akar tumbuhan inang (*Tetrastigma* sp.) yang secara morfologi mengalami penonjolan lebih jelas dibandingkan dengan material dari Gambar 1 & 2. Di dalam perkembangannya badan/materi yang tidak lain adalah jaringan endofit *R. patma* tampak sudah melakukan penetrasi jauh kedalam jaringan akar tumbuhan inang. Dari gambaran anatomi bahkan terlihat bahwa perkembangan jaringan endofit *Rafflesia* sudah mencapai berkas-berkas pengangkut tumbuhan inang, yang terpotong membujur, di bagian bawah. Ini merupakan fase yang penting bagi pertumbuhan jaringan endofit *Rafflesia*.

Dengan tercapainya kontak dengan berkas pengangkut (xylem dan phloem) tumbuhan inang maka jaringan endofit *Rafflesia* akan memperoleh pasokan air dan hara untuk kelanjutan hidupnya. Mekanisme pemotongan aliran nutrisi semacam ini merupakan suatu yang spesifik dilakukan oleh tumbuhan parasit terhadap tumbuhan inangnya. Namun yang terjadi pada *Rafflesia* mekanisme tersebut jauh lebih rumit dibandingkan dengan kelompok lain yang bersifat non endoparasit (kelompok *Loranthaceae*, *Viscaceae*, *Santalaceae*, *Cuscutaceae* dan lainnya). Pada kelompok tumbuhan ini pembentukan kanal penghubung (*haustorium*) dapat terlihat dengan jelas karena terjadi di permukaan tumbuhan inang, sedangkan pada kelompok endoparasit (termasuk *Rafflesia*) mekanisme pemotongan aliran nutrisi tidak didahului dan tidak melalui pembentukan organ penghubung tersebut.

Tidak diketahui secara pasti berapa lama proses perkembangan dari fase I ke fase II. Diantara kedua fase tersebut terjadi proses penyembuhan (*healing process*) pada sel-sel parenkima dan jaringan rizodermis tumbuhan inang yang semula mengalami kerusakan dan perubahan orientasi akibat adanya penetrasi jaringan parasit *Rafflesia*.

Fase III

Gambar 6 mewakili proses *establishment*, tampak dalam gambar adalah jaringan inang yang sudah bisa dipastikan ditumbuhi *R. patma*. Endofit seringkali diidentikkan dengan *mycelium* fungi, bercabang dan beranastomose di sepanjang jaringan inangnya. Tapi dari studi ini organ yang dimaksud (*filamen uniseriate* yang menjadi cikal-bakalnya parasit) belum berhasil ditemukan.

Karena hal tersebut di atas maka dari studi ini belum dapat dipastikan apakah satu individu bunga mewakili satu bunga yang berasal dari satu biji, atau beberapa bunga dalam inang yang sama berasal dari satu biji yang kemudian berkembang di dalam tubuh inang dan dapat muncul bunga di beberapa tempat, atau dengan kata lain satu bunga dengan bunga yang lain dihubungkan oleh *filament uniseriate* tersebut (beberapa bunga dari klon yang sama) yang dapat dikatakan bahwa parasitismenya terjadi secara sistemik.

KESIMPULAN

Berdasarkan perubahan yang terjadi pada sel-sel jaringan tumbuhan inang, pertumbuhan endofitik *Rafflesia patma* di dalam inang *Tetrastigma* sp. terdiri atas tiga fase, yaitu penetrasi, invasi dan *establishment*. Untuk mengetahui berapa lama proses yang terjadi dalam masing-masing fase tersebut dan melihat perkembangan dari satu biji menjadi satu bunga atau beberapa bunga masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut dengan mengamati lebih banyak sampel dari organ tubuh inang *Tetrastigma* sp. yang telah diketahui terinfeksi oleh *R. patma* dengan umur yang berbeda.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini di lapangan dibantu oleh Ngatari dan Melani Kurnia Riswati. Penelitian di laboratorium dilakukan di Laboratorium Morfologi, Anatomi dan Sitologi, Bidang Botani, Pusat Penelitian Botani dan dibantu oleh Ujang Hapid, untuk ini penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu

penelitian ini. Penelitian ini pada tahun ke 2 dan ke 3, mendapat bantuan dari UNESCO, untuk ini penulis mengucapkan terima kasih atas dukungannya. Kepada Dr.Irawati diucapkan terima kasih untuk sumbangan pemikirannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ben-Hod, G., Losner, D. Joel, D. M. and Mayer, A. M. (1993). Pectin methylesterase in calli and germinating seeds of *Orobanche aegyptiaca*. *Phytochemistry* 32: 1399-1402.
- Berlin G. P. and J. P. Miksche 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Brown, R. (1921). Account of a new genus of Plants, named *Rafflesia*. *Transaction of the Linnean Society of London* 13: 201 – 234.
- Fisher J. B. and F.W. Ewers. 1991. Structural responses to stem injury in vines. In Putz F. E., Mooney H. A. [eds.] *The Biology of Vines*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hidayati,S.N., W.Meijer and J.L. Waick. 2000. A contribution to the life history of the rare Indonesian holoparasite *Rafflesia patma* (Rafflesiaceae). *Biotropica* 32: 408-414.
- Kita Y, and M. Kato. 2005. Seedling developmental anatomy of an undescribed *Malaccotristicha* species (*Podostemaceae*, subfamily *Tristichoideae*) with implication for body plan evolution. *Plant Systematic and Evolution*. 254: 221-232.
- Kuijt, J. 1969. *The Biology of Parasitic Flowering Plants*. University of California Press. Berkeley.
- Meijer, W. 1997. Rafflesiaceae. *Flora Malesiana* (Ser.1) 13: 1-42.
- Nais, J. 2001. *Rafflesia of The World*. Sabah Park – Malaysia.
- Tennakoon, K.U, J.S. Pate & D. Arthur. 1997. Ecophysiological aspect of the woody hemiparasite *Santalum acuminatum* (R.Br.) A.DC. and its common host in South Western Australia. *Annals of Botany* 80: 245 - 256
- Yoder J. I. 1999. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. *Current opinion in Plant Biology* 2: 65-70.