

EFEKTIFITAS KLOROKUIN TERHADAP PERTUMBUHAN *Plasmodium falciparum* RADIASI SECARA *IN VITRO*

Darlina¹, Harry Nugroho E.S.¹, dan Anggi Restu A²

¹Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN

²Mahasiswa Institut Sains dan Teknologi Nasional

Email untuk korespondensi: mdarlina@batan.go.id

ABSTRAK

EFEKTIFITAS KLOROKUIN TERHADAP PERTUMBUHAN *Plasmodium falciparum* RADIASI SECARA *IN VITRO*. Dalam uji coba bahan vaksin malaria untuk mencegah relawan dari penyakit malaria maka digunakan chemoprophylaxis yang dikombinasikan dengan bahan vaksin yang akan diteliti. Klorokuin merupakan antimalaria yang umum digunakan sebagai chemoprophylaxis. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas klorokuin terhadap pertumbuhan *P. falciparum* 3D7 radiasi. Pengujian Efektivitas klorokuin dilakukan dengan mengencerkan larutan stok 100 µg/ml sebesar 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, dan 10⁻⁹. Masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam 40 µl suspensi sel darah merah terinfeksi parasit *P. falciparum* radiasi maupun yang tidak diradiasi dan diinkubasi pada 37°C. Jumlah parasit yang bertahan hidup dihitung setiap hari selama 7 hari melalui apusan tipis. Penambahan klorokuin pada parasit yang diradiasi memberikan respon menekan pertumbuhan parasit terjadi penurunan parasitemia pada semua pengenceran dan pada hari ke-5 parasit pada semua perlakuan mati. Pada parasit yang tidak diradiasi hanya pada pengenceran klorokuin 10⁻⁴ yang dapat menekan pertumbuhan parasit sehingga parasit mati pada hari ke-4. Pada pengenceran klorokuin yang lain, parasit tetap hidup hingga hari ke-7. Dapat disimpulkan klorokuin efektif dalam menekan pertumbuhan parasit radiasi.

Kata kunci : Klorokuin, kultur in vitro, *P. falciparum*, radiasi.

ABSTRACT

EFFECTIVENESS PLASMODIUM FALCIPARUM CHLOROQUINE RADIATION ON THE GROWTH IN VITRO. In a malaria vaccine trial materials to prevent volunteers from malaria then used chemoprophylaxis in combination with vaccine material to be studied. Chloroquine is commonly used as an antimalarial chemoprophylaxis. The purpose of this study was to determine the efficacy of chloroquine against *P. falciparum* 3D7 growth of radiation. Testing the effectiveness of chloroquine done by diluting the stock solution 100 µg / ml of 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, and 10⁻⁹. Each dilution put in 40 µL suspension of red blood cells infected with *P. falciparum* parasite radiation and non-irradiated and incubated at 37 ° C. The number of parasites that survive counted every day for 7 days through a thin smear. The addition of chloroquine on the irradiated parasites respond suppress parasite growth decline at all dilutions and parasitemia on day 5 dead parasites in all treatments. In the parasites non-irradiated only to chloroquine 10⁻⁴ dilution which can suppress the growth of the parasite to parasite death on day 4. While on the other dilution chloroquine, parasites remained alive until day 7. It can be concluded chloroquine is effective in suppressing the growth of parasitic radiation.

Keywords: Chloroquine, cultured in vitro, *P. falciparum*, radiation.

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyebab utama kematian pada Negara berkembang. Di Indonesia, malaria tersebar di seluruh pulau dengan derajat endemisitas yang berbeda-beda, spesies yang terbanyak

dijumpai adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*^[1]. Pada tahun 2003 malaria sudah tersebar di 6.053 desa pada 226 kabupaten di 30 provinsi. Kondisi tersebut diperberat dengan semakin luasnya parasit yang resisten terhadap obat anti malaria yang selama ini digunakan dan

nyamuk yang resisten terhadap insektisida^[2]. Adanya kemampuan parasit untuk tahan terhadap obat baru dan kemampuan vektor nyamuk untuk tahan terhadap insektisida, sehingga vaksin terhadap malaria sangat dibutuhkan. Melemahkan (atenuasi) mikroorganisma patogen merupakan strategi untuk pengembangan vaksin sejak pertama kali vaksin ditemukan oleh Louis Pasteur^[3]. Radiasi gamma dapat digunakan untuk menginaktivkan mikroorganisma untuk preparasi vaksin, disamping metode inaktivasi secara pemanasan atau kimia^[4].

P. falciparum merupakan parasit malaria menyerang manusia yang paling ganas merupakan penyebab sebagian besar kematian akibat malaria. Parasit ini sering menyumbat aliran darah ke otak, menyebabkan mengigau, koma, serta kematian^[5]. Proses patologi pada malaria ini adalah akibat siklus eritrosit. Beratnya penyakit malaria berhubungan dengan densitas parasit, serta berhubungan dengan kemampuan parasit bermultiplikasi baik di dalam hati maupun di dalam eritrosit. Siklus eritrositik menimbulkan tanda dan gejala karakteristik dan tidak mereda sampai hospes tersebut mati atau mengaktifkan respon imun yang mampu membunuh atau menekan pertumbuhan parasit^[6]. Iradiasi gamma digunakan untuk melemahkan parasit malaria dalam stadium darah untuk preparasi vaksin stadium darah yang diharapkan dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan plasmodium di dalam eritrosit dan menyebabkan reduksi parsial parasitemia sehingga menurunkan angka kematian penderita malaria. Pada penelitian terdahulu telah dilakukan pelemahan *Plasmodium falciparum* stadium eritrositik dengan menggunakan iradiasi gamma dengan kisaran dosis 0 – 175 Gy. Telah diperoleh hasil antara lain, 175 Gy merupakan dosis yang optimum untuk melemahkan parasit^[7].

Dalam penelitian vaksin malaria digunakan chemoprophylaxis yang dikombinasikan klorokuin dengan bahan vaksin yang akan diteliti untuk mencegah relawan dari penyakit malaria^[8]. Klorokuin (sebagai garam fosfat) berada dalam kelas obat yang disebut anti-malaria dan amubasida. Obat antimalaria adalah senyawa yang digunakan untuk pencegahan dan pengobatan malaria yang disebabkan oleh protozoa yaitu *Plasmodium sp* yang masuk ke dalam tubuh

tuan rumah (host) melalui gigitan nyamuk *Anopheles betina*. Cara kerja obat klorokuin adalah dengan menghancurkan bentuk eritrosit dari parasit malaria sehingga mencegah penyebaran plasmodia ke nyamuk *anopheles*. Klorokuin hanya efektif terhadap parasit dalam fase eritrosit, sama sekali tidak efektif terhadap parasit di jaringan [9]. Efektifitasnya sangat tinggi terhadap *P. vivax* dan *P. falciparum*. Selain itu, klorokuin juga efektif terhadap gamet *P. vivax*. Dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektifitas klorokuin terhadap *P. falciparum* sebagai penelitian awal dalam penelitian vaksin malaria radiasi.

METODE

Bahan uji:

Bahan yang digunakan Klorokuin diperoleh dari Eijkman. Bahan kultur (RPMI, RPHS) berkualitas analitik dari Gibco. Parasit yang digunakan *P.falciparum* strain 3D7 dari PTKMR-BATAN.

Propagasi *P.falciparum* pada kultur *in vitro*:

Pemeliharaan *P.falciparum* dengan parasitemia 1-2% pada cawan petri yang berisi medium RPHS dengan hematokrit 4%. Medium pertumbuhan diganti setiap hari.

Sinkronisasi Kultur *P. falciparum*

Sinkronisasi dilakukan pada kultur *P.falciparum* dengan parasitemia 1-2% yang didominasi bentuk merozoit. Selanjutnya dilakukan pemisahan supernatan dan *pack cell* dengan sentrifugasi 1200 rpm selama 10 menit. Sinkronisasi dilakukan dengan penambahan sorbitol 5% pada *pack cell*. Sinkronisasi dilakukan dua kali selang 12 jam^[10].

Iradiasi Kultur *P. falciparum*.

Parasit yang telah disinkronisasi kemudian diradiasi dengan sinar gamma, pada dosis 175 Gy dengan LD 380,45 Gy/jam di fasilitas Iradiator IRPASENA Pusat Aplikasi Teknologi Isotop Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional

Uji daya hambat Klorokuin:

Sebelum melakukan uji daya hambat pertumbuhan *P.falciparum*, parasit dipersiapkan dengan cara menyediakan serum, eritrosit tanpa parasit dan eritrosit terinfeksi *P. falciparum*. Stok klorokuin konsentrasi 100 µg/mL diencerkan 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ pada. Klorokuin yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam lempeng sumur uji yang

telah berisi 2 ml medium lengkap dengan hematokrit 4 % dan ditambahkan 160 µl suspensi sel parasit parasetamia awal 0,2 – 0,8 %. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari^[10].

Pengamatan

Pengamatan jumlah parasit dilakukan pada awal inokulasi hingga hari ke-7 meliputi angka parasitemia. Pertumbuhan parasit diamati dengan membuat sediaan apus darah tipis. Apusan dibiarkan mengering kemudian difiksasi dengan metanol. Apusan diwarnai dengan 5 % larutan Giemsa dan dibiarkan selama 20 menit. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Jumlah parasit yang hidup dihitung di bawah mikroskop. Persentase pertumbuhan (parasitemia) dihitung dengan cara menghitung jumlah darah yang terinfeksi parasit pada zat uji dan kontrol terhadap 5000 sel darah merah^[10].

Analisis Data

Uji statistik yang digunakan untuk menentukan perbedaan respon pertumbuhan parasit yang diradiasi dan yang tidak diradiasi terhadap perlakuan pengenceran klorokuin pada keempat belas kelompok adalah dengan uji homogenitas varians dan analisis *one way anova* ($p=0.05$). Jika ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan Turkey,s test ($p=0.05$).

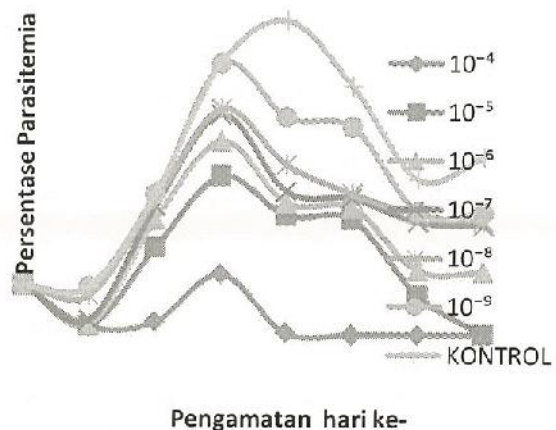
HASIL DAN PEMBAHASAN

Plasmodium falciparum di dalam darah mempunyai 3 tahapan perkembangan yaitu merozoit (cincin), trophozoit dan skizon. *P.falciparum* umumnya diawal infeksi dalam tubuh mempunyai perkembangan yang seragam tetapi di dalam kultur *in vitro* jarang dijumpai tahapan perkembangan yang seragam^[11]. Karena sifat ini maka pada kultur laboratorium perlu disinkronkan untuk memelihara parasit di tahap yang sama siklus sel mereka.

Tahapan sinkronisasi parasit dilakukan pada penelitian dengan tujuan untuk mensinkronisasi tahapan perkembangan dari parasit yang akan diuji pada satu siklus di dalam darah. Harmoni tahapan perkembangan parasit sangat diinginkan untuk tujuan penelitian analisis metabolomik, proteomik dan Transkriptome serta untuk skrining obat. Kebanyakan ilmuwan menggunakan bahan

kimia (biasanya sorbitol) untuk membunuh tahapan tertentu dari parasit untuk mendapatkan sinkronisasi. Penambahan Sorbitol digunakan untuk menyinkronkan *P. falciparum*. Eritrosit yang tidak terinfeksi impermiabel terhadap sorbitol. Sementara itu eritrosit yang terinfeksi dengan parasit malaria dalam bentuk matang (trophozoit, dan skizon) menunjukkan peningkatan permeabilitas terhadap sorbitol, memungkinkan sorbitol masuk eritrosit menyebabkan sel lisis^[12]. Dengan demikian penambahan sorbitol dalam suspensi sel akan menghasilkan sel eritrosit yang terinfeksi parasit dalam bentuk merozoit. Menurut Jensen Penambahan sorbitol dalam suspensi sel hanya memiliki parasit cincin tahap diperkirakan hingga 18 jam lama^[13]. Paparan sorbitol belum terbukti memiliki efek pada pertumbuhan parasit intraseluler^[12].

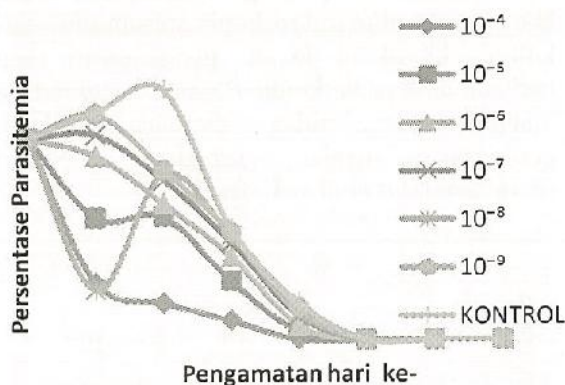
Pada kultur *P. falciparum* yang telah disinkronisasi dilakukan penambahan klorokuin dengan pengenceran sebesar 10^{-4} , 10^{-5} , hingga 10^{-9} dari stok awal 100 µg/ml. Pengamatan terhadap pertumbuhan parasit dilakukan dengan cara membuat apusan tipis pada kaca objek kemudian dilakukan pewarnaan dengan giemsa 5% dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Dari pengamatan mikroskopis apusan tipis dari kultur klorokuin dengan pengenceran yang berbeda baik pada kultur *P. falciparum* radiasi maupun yang tidak diradiasi terdapat perbedaan derajat kepadatan parasit (parasitemia) (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Pengaruh penambahan klorokuin terhadap pertumbuhan *P.falciparum* yang tidak diradiasi (0 Gy)

Perlakuan penambahan klorokuin yang diencerkan pada konsentrasi tertentu terhadap pertumbuhan *P.falciparum* 0 Gy disajikan pada Gambar 1.

Terlihat adanya perbedaan kurva parasitemia dari setiap perlakuan pengenceran klorokuin. Pada pengamatan hari pertama terjadi penurunan parasitemia pada semua perlakuan. Setelah itu terjadi peningkatan parasitemia hingga hari ke-3 pada kultur parasit yang diberikan perlakuan klorokuin. Puncak kurva yang tertinggi yaitu 4,32 % pada perlakuan klorokuin dengan pengenceran 10^{-9} . Puncak kurva parasitemia yang terendah (0,96%) pada perlakuan klorokuin dengan pengenceran 10^{-4} . Pada parasit yang tidak diberikan perlakuan klorokuin pertumbuhannya terus meningkat hingga hari ke-4. Setelah itu pertumbuhannya terus menurun hingga hari ke-6 dan meningkat kembali dihari ke-7. Hal ini terlihat adanya pengaruh penambahan klorokuin terhadap pertumbuhan parasit. Semakin tinggi konsentrasi yang ditambahkan semakin rendah pertumbuhannya. Puncak kurva parasitemia yang tertinggi adalah pada kontrol dan yang terendah pada perlakuan klorokuin dengan pengenceran 10^{-4}

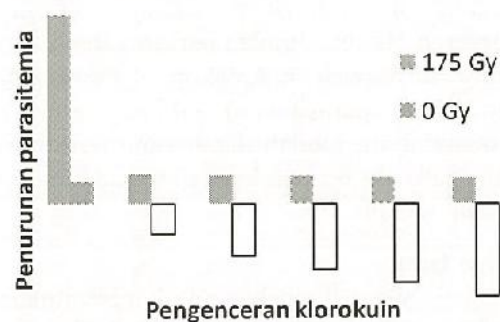


Gambar 2. Pertumbuhan *P.falciparum* 175 Gy pada medium RPHS yang diberi klorokuin dengan beberapa variasi pengenceran

Pengaruh klorokuin terhadap pertumbuhan parasit yang diradiasi disajikan pada Gambar 2. Peningkatan parasitemia di hari pertama terjadi pada perlakuan penambahan pengenceran klorokuin 10^{-9} sedangkan pada perlakuan yang lain terjadi penurunan parasitemia. Hal ini menunjukkan konsentrasi klorokuin sangat kecil pada pengenceran 10^{-9} sehingga sedikit sekali

mempengaruhi pertumbuhan parasit. Pada parasit kontrol peningkatan pertumbuhan terjadi hingga hari ke-2 setelah itu pertumbuhan parasit menurun.

Untuk mengetahui apakah klorokuin dapat menekan pertumbuhan parasit pada kultur invitro maka dilakukan perbandingan rerata persentase parasitemia dalam variasi dosis perlakuan dibandingkan dengan parasitemia sebelum perlakuan (H-0). Respon yang positif menunjukkan adanya penurunan pertumbuhan parasit sedangkan respon yang negatif menunjukkan adanya peningkatan pertumbuhan dari parasit.



Gambar 3. Pengaruh pengenceran klorokuin terhadap penurunan pertumbuhan parasit

Efek klorokuin untuk menekan pertumbuhan parasit disajikan pada Gambar 3. Semua pengenceran klorokuin memberikan efek yang positif dalam menekan pertumbuhan parasit yang diradiasi. Efek positif pada parasit yang tidak diradiasi hanya terjadi pada pengenceran klorokuin 10^{-4} . Hal ini menunjukkan klorokuin efektif dalam menekan pertumbuhan parasit yang diradiasi. Pada parasit tidak diradiasi efek menekan pertumbuhan parasit hanya terjadi pada klorokuin pengenceran 10^{-4} .

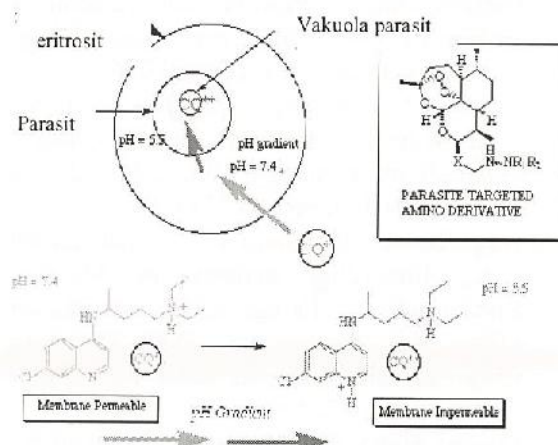
Analisis data pengaruh pengenceran klorokuin terhadap pertumbuhan parasit yang diradiasi maupun yang tidak diradiasi pada ke empat belas perlakuan dilakukan dengan analisis *one way anova* ($p=0,05$). Berdasarkan uji *one way anova*, p yang diperoleh 0,01 lebih kecil dari 0,05 sehingga H_0 ditolak. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan antara rerata parasitemia pada ke-14 perlakuan. Untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Turkey-HSD. Hasil uji Turkey's menunjukkan tidak terdapat perbedaan sangat

bermakna diantara perlakuan pengenceran klorokuin maupun tanpa penambahan klorokuin pada parasit 175 Gy, $p=0,05$. Perbedaan bermakna antara parasit 175 Gy dengan perlakuan pengenceran klorokuin terhadap parasit 0 Gy terjadi pada 0 Gy pengenceran klorokuin 10^{-8} , 10^{-9} . Pada parasit 0 Gy perbedaan bermakna terjadi antara pengenceran 10^{-4} dengan 10^{-8} , 10^{-9} , dan tanpa klorokuin serta antara pengenceran 10^{-5} dengan perlakuan tanpa klorokuin pada $p=0,05$. Di antara parasit 0 Gy dengan pengenceran selain 10^{-4} dan 10^{-5} menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna.

Pada perlakuan kontrol (tanpa penambahan klorokuin), terjadi perbedaan bermakna antara parasit 175 Gy dengan parasit tidak diradiasi (0 Gy). Pertumbuhan parasit 0 Gy hingga hari ke-7 pertumbuhan parasit 2,8% sedangkan pada parasit 175 Gy pertumbuhan parasit tertinggi 0,95 % pada hari ke-2 dan semua parasit mati hari ke-6 (Gambar 1 dan 2). Hal ini menunjukkan radiasi menyebabkan parasit melemah sehingga pertumbuhan terhambat. Radiasi pengion memiliki ciri khusus karena kemampuannya untuk penetrasi sel dan jaringan sehingga memberikan energi pada sel dalam bentuk ionisasi. Target utama penyinaran adalah materi genetik atau DNA. Dalam pembuatan bahan vaksin, jenis radiasi yang biasanya digunakan adalah sinar gamma yang memiliki sifat daya tembus tinggi dan panjang gelombang pendek. Dosis iradiasi yang optimum akan menghancurkan DNA, sehingga membuat mikroorganisme tidak mampu melakukan replikasi [14]. Selain itu radiasi juga mempengaruhi struktur selular dan molekular parasit. Berdasarkan penelitian Miranda dkk., menyebutkan bahwa radiasi dapat menginduksi perubahan selular dan molekular pada *P.falciparum*. Radiasi menyebabkan parasit mengalami mitosis yang tidak sempurna, sitoplasma yang menyebar, mengecilnya ribosom, organel yang menggumpal, dan vakuola yang membesar sehingga sesuai dengan gambaran parasit yang stress^[15]. Dengan demikian teknik radiasi dapat digunakan untuk membuat bahan vaksin.

Dalam uji coba bahan vaksin malaria untuk mencegah relawan dari penyakit malaria maka digunakan chemoprophylaxis yang dikombinasikan dengan bahan vaksin yang akan diteliti. Klorokuin merupakan antimalaria

yang umumnya digunakan sebagai chemoprophylaxis. *Plasmodium falciparum* untuk kelangsungan hidupnya memerlukan zat makanan yang diperoleh dengan cara mencerna hemoglobin dan vacuola makanan yang bersifat asam. Hemoglobin yang dicerna selain menghasilkan asam amino yang menjadi nutrient bagi parasit, juga menghasilkan zat toksik yang disebut ferritytoporphyrin (FP IX). Klorokuin dan antimalaria yang mengandung cincin quinolin akan membentuk kompleks dengan ferritytoporphyrin (FP IX) dalam vacuola. Kompleks obat-FP IX tersebut sangat toksik dan tidak dapat bergabung membentuk pigmen. Toksin kompleks obat-FP IX meracuni vacuola menghambat ambilan (*intake*) makanan sehingga parasit mati kelaparan. 5,6Kompleks klorokuin-FP IX juga mengganggu permeabilitas membrane parasit dan pompa proton membrane. Mekanisme kerja yang lain adalah dengan berinteraksi dengan DNA parasit dan menghambat DNA polimerase (kuinin). Klorokuin juga bersifat basa lemah sehingga, masuknya klorokuin ke dalam vakuola makanan yang bersifat asam akan meningkatkan pH organel tersebut. Perubahan pH akan menghambat aktivitas aspartase dan cysteinase protease yang terdapat di dalam vakuola makanan sehingga metabolisme parasit terganggu (Gambar 3) [16].



Gambar 3. Mekanisme aksi klorokuin dan golongan kuinolin terhadap *P.falciparum* [9]

Berdasarkan hasil penelitian seperti yang disebutkan di atas menunjukkan radiasi melemahkan parasit sehingga klorokuin dengan pengenceran 10^{-9} memberikan efek yang dapat menekan pertumbuhan parasit yang

diradiasi. Pada parasit yang tidak diradiasi klorokuin efektif menekan pertumbuhan parasit pada pengenceran 10^{-4} atau 0,01 ug/ml.

KESIMPULAN

Klorokuin merupakan antimalaria yang umumnya digunakan sebagai chemoprophylaxis dalam penelitian vaksin malaria. Berdasarkan hasil penelitian seperti yang disebutkan di atas Klorokuin pada pengenceran 10^{-9} (0,001 ng/ml) masih efektif menekan pertumbuhan parasit yang diradiasi. Pada parasit yang tidak diradiasi klorokuin yang efektif menekan pertumbuhan parasit pada pengenceran 10^{-4} (0,01 µg/ml).

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, Malaria pada manusia, Info Penyakit Menular; Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan, DepKes RI, 2 Desember. (2004)
2. Jakarta post, Malaria cases in Indonesia increases to about 3M in 2007: Health Official Says, January 21. (2008)
3. Plotkin, S.L., and Plotkin, S. A., A short history of vaccination. In "Vaccine" 3rd ed., S. A Plotkin and W.A. Orenstein, Eds., pp. 1-12. Philadelphia Saunders.(1999)
4. Raz eyal and Joshua F., Using gamma radiation preserves T-cell responses in bacteria vaccine, Professor of Medicine at University of California, San Diego (UCSD) School of Medicine.(2006)
5. Giles HM, The malaria parasites, in Giles HM, Warrel DA (Eds), Bruce Chwatt, essential malariaology, 3th. Ed., Edward Arnold, London, pp. 12-27.(1993)
6. Nugroho A., Harijanto P. N., dan Datau E.A., Imunologi malaria in Malaria: Epedemiologi, Patogenesis, manifestasi klinis, dan penanganan, P.N. Harijanto (Ed)., Jakarta: Penerbit buku kedokteran (EGC), 128-147.(2000)
7. Darlina Harry N., Dita, dan Nurhayati S., Pengaruh Radiasi terhadap Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* Strain NF54 Stadium Eritrositik, Prosiding Seminar Nasional Keselamatan Kesehatan dan Lingkungan VII. PTKMR-BATAN, BAPETEN, KEMENKES-RI dan Pusarpedal- KLH.(2011)
8. Chwatt B., Black R., Canfield C., Cyde D., Peters, and Wernsdorfer, Chemotherapy of Malaria. WHO Geneva, 24-45.(1986)
9. Krogstat, D. J., Gluzman I. Y., and Kyle D. E. et al., Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum* mechanism Of Chloroquine Resistance. Science 238 .1283-85.(1987)
10. Ljungstrom I., Perlaman,H., Schilchtherle, M., Shere, A., and Wahlgreen, M., Methods In Malaria Research, MR4/ATCC, Manassas Virginia.(2004)
11. Trager W., and Jensen J. B., Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-675.(1976)
12. Lambros C., and Vanderberg J. P., Synchronisation of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology 65, 418-420.(1979)
13. Jensen J. B., Trager W., and Doherty J., *Plasmodium falciparum*: continuous cultivation in a semiautomated apparatus. Experimental Parasitology 48, 36-41.(1979)
14. Biello, D., Irradiated pathogens used to create potent vaccine, Science News, July, 26.(2006)
15. Miranda S.O., Noel Gerald, V A., Yamei G., and Victoria M, Radiation Induced Cellular and Molecular Alterations in Asexual Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* Parasites, J Infect Dis.(2012)