

POTENSI KOMBINASI KLOROKUIN DAN ASAM URSOLAT DALAM MENEKAN PARASITEMIA *Plasmodium berghei* ANKA SECARA *IN VIVO*

Faizal Hermanto*, Adedhyfa Ayuning Tyas, Sri Wahyuningsih

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi, Indonesia.

*Penulis Korespondensi: faizal.hermanto@lecture.unjani.ac.id

ABSTRAK

Malaria masih menjadi ancaman kesehatan global yang serius, dengan 249 juta kasus dan 608.000 kematian tercatat pada tahun 2022. Resistensi *Plasmodium* terhadap klorokuin menjadi tantangan utama yang mendorong perlunya strategi terapi baru berbasis kombinasi obat. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antimalaria kombinasi klorokuin dan asam ursolat terhadap *Plasmodium berghei* ANKA pada mencit jantan Swiss Webster secara *in vivo* menggunakan metode Peters supresif 4 hari. Hewan uji dibagi menjadi enam kelompok: kontrol negatif (Na CMC 0,5%), klorokuin 20 mg/kg BB, asam ursolat 50 mg/kg BB, serta tiga kelompok kombinasi dengan rasio dosis berbeda. Parameter yang diamati meliputi persen parasitemia, persen pertumbuhan, dan persen hambatan parasit. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi klorokuin 15 mg/kg BB dan asam ursolat 12,5 mg/kg BB menghasilkan hambatan pertumbuhan parasit sebesar 100%, setara dengan monoterapi klorokuin 20 mg/kg BB. Kombinasi lainnya juga menunjukkan hambatan yang sangat tinggi (96,15–98,49%). Temuan ini mengindikasikan bahwa asam ursolat berpotensi sebagai agen komplementer yang memungkinkan pengurangan dosis klorokuin tanpa mengurangi efektivitas terapi.

Kata Kunci: Malaria, *Plasmodium berghei* ANKA, Klorokuin, Asam ursolat, Antimalaria, Kombinasi obat, Resistensi.

ABSTRACT

Malaria remains a serious global health threat, with 249 million cases and 608,000 deaths recorded in 2022. Resistance of *Plasmodium* to chloroquine has become a major challenge, necessitating new combination-based therapeutic strategies. This study aimed to evaluate the antimalarial activity of a combination of chloroquine and ursolic acid against *Plasmodium berghei* ANKA in male Swiss Webster mice using the Peters 4-day suppressive method. Animals were divided into six groups: negative control (0.5% Na CMC), chloroquine 20 mg/kg BW, ursolic acid 50 mg/kg BW, and three combination groups with varying dose ratios. Parameters observed included percent parasitemia, percent parasite growth, and percent inhibition. Results showed that the combination of chloroquine 15 mg/kg BW and ursolic acid 12.5 mg/kg BW achieved 100% parasite growth inhibition, equivalent to chloroquine monotherapy at 20 mg/kg BW. Other combinations also demonstrated very high inhibition rates (96.15–98.49%). These findings indicate that ursolic acid has potential as a complementary agent that may allow dose reduction of chloroquine without compromising therapeutic efficacy.

Keywords: Malaria, *Plasmodium berghei* ANKA, Chloroquine, Ursolic acid, Antimalarial, Drug combination, Resistance.

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit parasitik yang telah menjadi beban kesehatan global selama ribuan tahun, namun ironisnya masih belum sepenuhnya terkendali hingga saat ini. Menurut laporan terbaru *World Health Organization* (WHO), pada tahun 2022 tercatat 249 juta kasus malaria di seluruh dunia dengan 608.000 kematian yang meningkat dari 229 juta kasus dan 400.000 kematian pada 2019 (WHO, 2023). Beban penyakit ini secara tidak proporsional mendominasi wilayah Afrika, yang menyumbang sebagian besar kasus, dengan anak-anak di bawah usia lima tahun menjadi kelompok yang paling rentan karena belum memiliki sistem kekebalan yang matang (WHO, 2023). Penyakit ini disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Plasmodium*, yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi. Di antara spesies yang menginfeksi manusia, *Plasmodium falciparum* adalah yang paling berbahaya dan bertanggung jawab atas sebagian besar kasus malaria berat hingga komplikasi fatal (Dheda *et al.*, 2017). Di Indonesia sendiri, tantangan menuju eliminasi malaria nasional masih sangat besar dan fluktuatif. Berdasarkan data statistik

resmi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dalam kurun waktu lima tahun terakhir, tren kejadian malaria di Indonesia menunjukkan dinamika yang memerlukan perhatian serius. Tahun 2018, tercatat sebanyak 222.085 kasus konfirmasi secara nasional, yang kemudian mengalami kenaikan pada tahun 2019 menjadi 250.644 kasus. Selama masa pandemi COVID-19 di tahun 2020, pelaporan kasus sempat mengalami fluktuasi akibat pembatasan akses kesehatan sehingga tercatat sebanyak 226.363 kasus. Namun, setelah periode tersebut, angka kejadian melonjak tajam dalam dua tahun berikutnya, yakni menyentuh 304.607 kasus pada tahun 2021 dan meningkat signifikan menjadi 443.530 kasus pada tahun 2022 (Kemenkes RI, 2023). Tingginya beban kasus yang didominasi oleh wilayah endemik seperti Papua, Nusa Tenggara Timur, dan Maluku ini mempertegas bahwa Indonesia masih berada dalam bayang-bayang ancaman malaria yang persisten (Djaafara, 2025).

Kondisi epidemiologi yang berat ini diperparah oleh munculnya dan penyebaran resistensi parasit terhadap obat-obatan antimalaria standar. Klorokuin, senyawa golongan 4-aminokuinolin yang pernah menjadi lini

pertama pengobatan malaria karena efikasi yang tinggi, biaya rendah, dan profil keamanan yang baik, kini telah mengalami kegagalan terapeutik yang luas di berbagai wilayah endemik akibat resistensi yang dimediasi oleh mutasi pada gen *pfcr*t yang mengkode *P. falciparum* *Chloroquine Resistance Transporter* (PfCRT) dan gen *pfmdr1* (Dubar *et al.*, 2011). Meskipun Terapi Kombinasi Berbasis Artemisinin (ACT) saat ini digunakan sebagai standar emas pengobatan untuk mengatasi resistensi klorokuin, laporan terbaru mengenai penurunan sensitivitas parasit terhadap artemisinin di Asia Tenggara menimbulkan kekhawatiran global akan potensi kegagalan pengobatan di masa depan (Ashley *et al.*, 2014). Oleh karena itu, strategi baru untuk memperpanjang masa pakai obat yang ada atau menemukan agen penurun resistensi (*resistance-modifying agents*) menjadi sangat mendesak. Salah satu pendekatan yang paling menjanjikan adalah strategi kombinasi obat (*drug combination strategy*), yang menggabungkan obat antimalaria konvensional dengan senyawa aktif bahan alam (fitokimia) yang memiliki mekanisme aksi sinergis atau komplementer (Osei *et al.*, 2021). Strategi ini bertujuan untuk

meningkatkan efikasi terapeutik, meminimalkan toksisitas dengan menurunkan dosis masing-masing obat, dan yang terpenting, menghambat atau memperlambat perkembangan resistensi obat oleh parasit (Li *et al.*, 2018). Melalui terapi kombinasi, parasit dihambat melalui jalur biokimia yang berbeda secara simultan, sehingga memperkecil peluang organisme untuk bertahan hidup. Tanaman obat sendiri telah lama menjadi inspirasi utama pengembangan antimalaria, terbukti dari penemuan artemisinin yang diisolasi dari *Artemisia annua*, yang mendorong eksplorasi lebih lanjut terhadap golongan senyawa lain seperti triterpenoid (Ceravolo *et al.*, 2021).

Asam ursolat (UA), sebuah senyawa triterpenoid pentasiklik yang tersebar luas dalam berbagai tumbuhan obat seperti *Eugenia uniflora*, telah menarik perhatian besar karena spektrum aktivitas biologisnya yang luas, termasuk sebagai agen antiinflamasi, antioksidan, tumor, dan antimalaria (Mlala *et al.*, 2019). Studi Asanga *et al.* (2024) membuktikan bahwa asam ursolat dari akar *Nauclea latifolia* mampu berikatan dengan protein target kunci parasit, yaitu PfEMP-1 dan PfPKG, dan menunjukkan

aktivitas antiplasmodial *in vivo* pada model *P. berghei*. Sementara itu, Ndwammbi *et al.* (2024) mengungkapkan bahwa derivat asam ursolat asetat menghambat fungsi chaperone PfHsp90, protein yang vital bagi kelangsungan hidup parasit dalam kondisi stres. Selain itu, asam ursolat juga diidentifikasi mampu memodulasi jalur sinyal esensial parasit melalui penghambatan protein kinase G (PfPKG) serta berikatan dengan *erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP-1) yang berperan krusial dalam proses invasi eritrosit (Asanga *et al.*, 2024).

Meskipun potensi asam ursolat sebagai agen antimalaria telah banyak diteliti secara mandiri, sejumlah permasalahan kritis dalam pengembangan terapinya masih belum terjawab secara terperinci. Pertama, sebagian besar studi terdahulu berfokus pada efikasi monoterapi asam ursolat atau derivat semisintesisnya, sehingga profil efikasi dan interaksi farmakodinamik ketika dikombinasikan langsung dengan klorokuin secara *in vivo* dalam bentuk sediaan oral masih belum jelas. Kedua, belum ada data konkrit yang merinci bagaimana variasi rasio dosis antara klorokuin dan asam

ursolat dapat memengaruhi efektivitas penekanan parasit secara optimal. Penentuan rasio dosis ini menjadi masalah krusial karena interaksi antar senyawa obat bersifat kompleks; proporsi yang tidak tepat dapat menghasilkan efek antagonis yang menurunkan efikasi klorokuin, sedangkan rasio yang tepat dapat menghasilkan efek sinergis yang kuat. Oleh karena itu, penelitian ini dirancang untuk memecahkan rumusan masalah mengenai pengaruh variasi rasio dosis kombinasi oral klorokuin dan asam ursolat terhadap efikasi penekanan parasit, serta menentukan proporsi dosis minimum yang mampu memberikan supresi parasitemia maksimal.

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* menggunakan model mencit jantan Swiss Webster yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* ANKA melalui metode tes supresif 4 hari Peters (*Peters' 4-day suppressive test*) yang telah divalidasi secara internasional (Peters, 1995). Evaluasi dilakukan dengan membandingkan parameter persen parasitemia, laju pertumbuhan, dan persentase hambatan parasit antara kelompok kontrol negatif, monoterapi klorokuin, monoterapi asam ursolat, serta kelompok kombinasi dengan tiga

variasi rasio dosis terukur. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan implikasi strategis baik pada skala laboratorium maupun aplikasi klinis jangka panjang. Secara teoritis, keberhasilan penemuan rasio kombinasi yang optimal akan memperkuat konsep *multi-target therapy* berbasis fitokimia, khususnya dalam mengintegrasikan agen yang bekerja pada polimerisasi heme (klorokuin) dan agen pengganggu proteostasis atau invasi parasit (asam ursolat). Secara praktis, implikasi klinis utama dari studi ini adalah membuka peluang reduksi dosis klorokuin dalam regimen terapi tanpa menurunkan efikasi penyembuhannya.

METODE PENELITIAN

Rasionalisasi Pemilihan Model Penelitian dan Sampel Uji

Pemilihan model *in vivo* menggunakan mencit Swiss Webster yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA didasarkan pada kemampuan model ini dalam mereplikasi interaksi sistemik yang kompleks antara inang (*host*), parasit, dan obat, yang tidak dapat digambarkan sepenuhnya melalui uji *in vitro*. *P. berghei* menyebabkan malaria berat dan mematikan pada mencit, dengan morfologi dan tahapan siklus

intra-eritrosit mirip infeksi manusia, sehingga cocok untuk uji kemoterapi darah stadium aseksual (Burgert *et al.*, 2020).

Sementara itu, kombinasi klorokuin (CQ) dan asam ursolat (UA) dipilih sebagai sampel uji berdasarkan pendekatan strategi terapi *multi-target*. Klorokuin adalah obat standar (4-aminokuinolin) yang bekerja spesifik menghambat polimerisasi heme di vakuola makanan parasit, sedangkan asam ursolat adalah senyawa triterpenoid pentasiklik alam yang memiliki jalur target berbeda, yaitu menguji fungsi *chaperone* PfHsp90 dan menghambat protein kinase G (PfPKG). Penggabungan kedua senyawa dengan mekanisme aksi yang berbeda ini ditujukan untuk menciptakan efek komplementer atau sinergis dalam menekan parasitemia, sekaligus menjadi strategi potensial untuk menurunkan dosis klorokuin sehingga dapat meminimalkan toksisitas dan menghambat laju resistensi obat.

Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan klorokuin fosfat (Sigma-Aldrich, India) dan asam ursolat (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., China) sebagai

bahan uji utama. Bahan pendukung meliputi Na CMC 0,5%, NaCl fisiologis 0,9%, NaOH 2N, larutan pewarna Giemsa, metanol, dan minyak imersi. *Plasmodium berghei* ANKA diperoleh dari Laboratorium Malaria, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan jenis Swiss Webster berusia 7–8 minggu dengan berat badan 20–35 gram. Semua prosedur penelitian yang melibatkan hewan uji dilaksanakan sesuai dengan prinsip-prinsip etika penggunaan hewan percobaan (3R: *Replacement, Reduction, Refinement*). Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik praklinik Universitas Jenderal Achmad Yani No. 10005.5/KEP-UNJANI/III/2024.

Penentuan Dosis Kombinasi

Dasar pemberian dosis kombinasi dalam penelitian ini mengacu pada modifikasi desain rasio tetap (*fixed-ratio combination design*) dari dosis efektif tunggal masing-masing senyawa, yaitu klorokuin (20 mg/kg BB) dan asam ursolat (50 mg/kg BB). Pendekatan ini membagi total fraksi dosis kombinasi

menjadi interaksi linier berpasangan (75%:25%, 50%:50%, dan 25%:75%). Proporsi persentase dosis yang diuji dirancang untuk melihat pergeseran efikasi ketika dosis klorokuin dikurangi secara bertahap dan digantikan oleh peningkatan proporsi dosis asam ursolat.

Pembuatan Sediaan Uji

Suspensi Na CMC 0,5% dibuat sebagai pembawa dengan melarutkan 0,5 g Na CMC dalam 100 mL aquadest menggunakan teknik pengembangan bertahap. Suspensi klorokuin dibuat pada konsentrasi 0,8 mg/mL (setara dosis 20 mg/kg BB), sedangkan suspensi asam ursolat dibuat pada konsentrasi 2 mg/mL (setara dosis 50 mg/kg BB). Untuk kelompok kombinasi, tiga variasi rasio dosis disiapkan:

- Kombinasi Dosis I: Klorokuin 15 mg/kg BB + Asam ursolat 12,5 mg/kg BB
- Kombinasi Dosis II: Klorokuin 10 mg/kg BB + Asam ursolat 25 mg/kg BB
- Kombinasi Dosis III: Klorokuin 5 mg/kg BB + Asam ursolat 37,5 mg/kg BB

Desain Penelitian dan Prosedur Uji *In Vivo*

Penelitian menggunakan metode Peters supresif 4 hari, suatu metode standar yang telah divalidasi secara internasional untuk pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* (Peters, 1975). Mencit diinokulasi secara intraperitoneal dengan suspensi eritrosit terinfeksi *P. berghei* ANKA sebanyak 200 μ L (mengandung 1×10^7 parasit/mL). Hewan uji yang sudah terinfeksi dibagi secara acak menjadi enam kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari lima ekor mencit:

1. Kelompok I (Kontrol Negatif): Na CMC 0,5%
2. Kelompok II (Pembanding Klorokuin): Klorokuin 20 mg/kg BB
3. Kelompok III (Pembanding Asam Ursolat): Asam ursolat 50 mg/kg BB
4. Kelompok IV (Kombinasi Dosis I): Klorokuin 15 mg/kg BB + Asam ursolat 12,5 mg/kg BB
5. Kelompok V (Kombinasi Dosis II): Klorokuin 10 mg/kg BB + Asam ursolat 25 mg/kg BB

6. Kelompok VI (Kombinasi Dosis III): Klorokuin 5 mg/kg BB + Asam ursolat 37,5 mg/kg BB

Pemberian obat diberikan secara per oral dimulai dan dilanjutkan selama empat hari berturut-turut (hari ke-0 hingga hari ke-3).

Pengukuran Parasitemia dan Analisis Data

Persentase parasitemia dihitung setiap hari (hari ke-0 hingga hari ke-4) melalui pemeriksaan apusan darah tipis yang diwarnai dengan larutan Giemsa 10%. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 $\times$ menggunakan minyak imersi, menghitung jumlah eritrosit terinfeksi dari 1.000 eritrosit yang diamati.

Rumus yang digunakan:

- % Parasitemia = (Jumlah eritrosit terinfeksi / 1.000 eritrosit) $\times$ 100%
- % Pertumbuhan Parasit = % Parasitemia hari ke-4 – % Parasitemia hari ke-0
- % Hambatan = $100\% - [(\% \text{ Pertumbuhan kelompok uji} / \% \text{ Pertumbuhan kontrol negatif}) \times 100\%]$

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism versi 9 dengan uji ANOVA satu arah diikuti uji *post-hoc*

Tukey pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

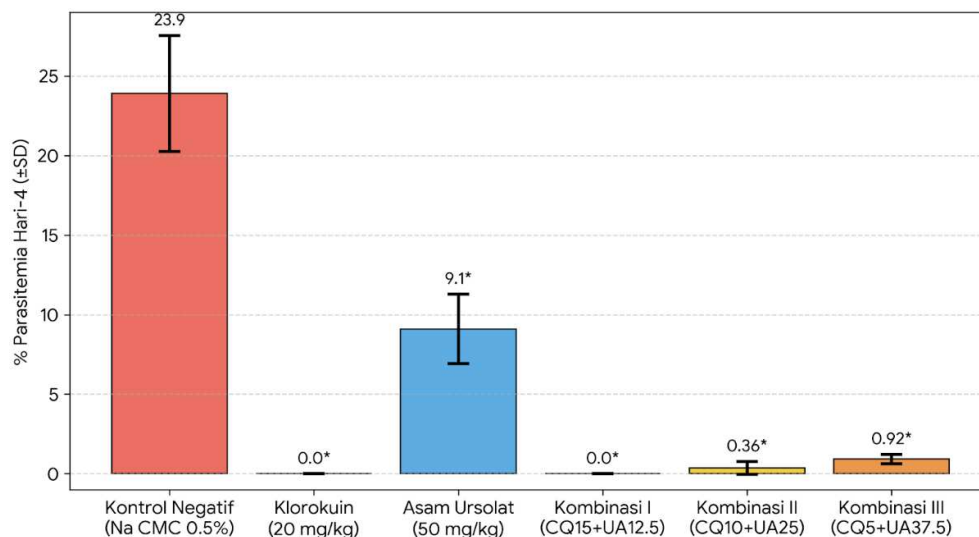
Hasil pengujian menunjukkan bahwa klorokuin 20 mg/kg BB mampu menekan pertumbuhan *P. berghei* ANKA hingga 100%, tidak ada satu pun parasit yang terdeteksi pada apusan darah hari ke-4, dengan persen parasitemia $0,00 \pm 0,00\%$. Angka ini konsisten dengan mekanisme kerja klorokuin yang sudah dipahami dengan baik: obat ini berakumulasi dalam vakuola makanan parasit, menghambat konversi heme bebas yang toksik menjadi hemozoin yang inert, sehingga parasit mati akibat akumulasi produk metabolisme toksik miliknya sendiri (Coronado *et al.*, 2014). Meskipun demikian, efektivitas penuh ini harus dimaknai dalam konteks yang lebih luas. Pada penelitian ini, strain *P. berghei* ANKA yang digunakan belum resistensi, sehingga klorokuin masih bekerja optimal. Dalam kenyataan klinis, resistensi klorokuin telah menyebar luas didorong oleh mutasi pada gen *pfcr* dan *pfmdr1* yang memungkinkan parasit memompa klorokuin keluar dari vakuola makanan sebelum mencapai konsentrasi toksik (Ibraheem, 2017). Bankole *et*

al. (2020) bahkan melaporkan bahwa ekstrak *Markhamia tomentosa* dapat memulihkan sensitivitas klorokuin pada strain *P. berghei* yang telah diinduksi resistensi, menegaskan bahwa pendekatan kombinasi bukan sekadar pilihan alternatif, melainkan kebutuhan strategis untuk menghadapi realitas klinis. Asam ursolat 50 mg/kg BB menunjukkan aktivitas antimalaria yang bermakna dengan persen parasitemia $9,1 \pm 2,19\%$ dan hambatan $61,92\%$ pada hari ke-4. Meskipun tidak setara dengan klorokuin, angka ini jauh lebih rendah dari kelompok kontrol (parasitemia $23,9 \pm 3,64\%$, hambatan 0%), membuktikan bahwa asam ursolat memiliki aktivitas antimalaria intrinsik yang nyata. Mekanisme kerja asam ursolat sebagai antimalaria bersifat multi-target, dan inilah yang menjadikannya kandidat kombinasi yang sangat menarik. Ndwammbi *et al.* (2024) melaporkan bahwa asam ursolat asetat, derivat dari asam ursolat mampu berikatan dengan domain N-terminal PfHsp90 (*heat shock protein 90* dari *P. falciparum*), mengganggu fungsi *chaperone* protein ini dan menyebabkan akumulasi protein yang salah lipat yang bersifat letal bagi parasit. PfHsp90 adalah protein esensial yang berperan dalam menjaga

proteostasis parasit, terutama saat parasit menghadapi kondisi stres seperti paparan obat-obatan, menjadikannya target yang sangat strategis. Melengkapi temuan tersebut, Asanga *et al.* (2024) menggunakan pendekatan *molecular docking* dan uji *in vivo* menunjukkan bahwa asam ursolat dari akar *Nauclea latifolia* berikatan dengan PfEMP-1 (*erythrocyte membrane protein 1*) dan PfPKG (*protein kinase G*), dua protein yang berperan krusial dalam proses invasi eritrosit dan regulasi siklus hidup parasit. Penghambatan PfPKG secara khusus sangat menjanjikan karena kinase ini terlibat dalam berbagai proses seluler parasit, mulai dari egres merozoit dari eritrosit hingga diferensiasi gametosit.

Hasil penelitian asam ursolat lainnya yang dilaporkan oleh de Medeiros *et al.* (2021), melaporkan bahwa derivat semisintesis asam ursolat

aktif terhadap strain *P. falciparum* yang resisten klorokuin, dengan salah satu molekul diusulkan berikatan dengan kompleks topoisomerase II-DNA berdasarkan pemodelan *in silico*. Ini mengisyaratkan bahwa asam ursolat bekerja melalui jalur yang berbeda dari klorokuin. Perbedaan mekanisme kerja inilah yang menjadi nilai tambah fundamental dalam konteks terapi kombinasi. Temuan paling signifikan dari penelitian ini adalah aktivitas antimalaria pada kelompok kombinasi yang ditampilkan pada Gambar 1. Kombinasi Dosis I (klorokuin 15 mg/kg BB + asam ursolat 12,5 mg/kg BB) menunjukkan persen parasitemia $0,00 \pm 0,00\%$ pada hari ke-4, setara dengan klorokuin monoterapi 20 mg/kg BB, namun dengan dosis klorokuin yang 25% lebih rendah. Ini merupakan indikasi kuat adanya efek sinergis atau setidaknya aditif antara kedua senyawa.



Gambar 1. Persentase parasitemia *Plasmodium* sp. pada Hari-4 setelah perlakuan tunggal dan kombinasi Klorokuin dan Asam Ursolat. $*=p < 0,05$ terhadap kelompok kontrol negatif.

Kombinasi Dosis II (klorokuin 10 mg/kg BB + asam ursolat 25 mg/kg BB) menunjukkan Tingkat parasitemia 0,36%, sementara Kombinasi Dosis III (klorokuin 5 mg/kg BB + asam ursolat 37,5 mg/kg BB) menunjukkan Tingkat parasitemia 0,92%. Ketiganya secara statistik berbeda bermakna dari kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Menariknya, bahkan pada dosis klorokuin yang hanya seperempat dari dosis monoterapi (5 mg/kg BB), kombinasi dengan asam ursolat masih mampu menghasilkan hambatan di atas 96%. Pola hasil ini sangat konsisten dengan temuan dari berbagai studi kombinasi yang telah dipublikasikan. Osei *et al.* (2021) melaporkan

sinergisme antara xylopic acid dengan amodiaquine dan artesunate pada model *P. berghei* ANKA, di mana kombinasi fitokimia dengan obat standar menghasilkan peningkatan efektivitas yang signifikan dibandingkan monoterapi. Dalam studi tersebut, seperti halnya dalam penelitian ini, perbedaan mekanisme kerja antara kedua komponen menjadi kunci keberhasilan kombinasi. Lebih jauh, Sibiya *et al.* (2016) menunjukkan bahwa asam oleanolat senyawa triterpenoid pentasiklik yang secara struktural berkerabat dekat dengan asam ursolat, hanya berbeda pada posisi gugus metil mampu menurunkan parasitemia dan mempercepat eliminasi parasit pada

model *P. berghei* *in vivo*, baik sebagai monoterapi maupun dalam kombinasi dengan klorokuin. Kemiripan struktural ini menguatkan dasar ilmiah penggunaan asam ursolat sebagai agen kombinasi dengan klorokuin.

Perspektif dari strategi pengobatan, kemampuan kombinasi untuk mencapai efektivitas setara klorokuin penuh dengan dosis klorokuin yang lebih rendah memiliki implikasi yang sangat penting. Pertama, pengurangan dosis klorokuin dapat mengurangi tekanan selektif pada parasit, sehingga memperlambat laju perkembangan resistensi sesuai dengan prinsip dasar terapi kombinasi yang direkomendasikan WHO. Kedua, dosis klorokuin yang lebih rendah berpotensi mengurangi efek samping obat jangka panjang. Ketiga, integrasi senyawa alam seperti asam ursolat ke dalam regimen ini membawa target kerja yang berbeda yang akan mendukung aktivitas antimalaria klorokuin. Disparitas mekanisme aksi molekuler tersebut diharapkan mampu menghasilkan efek sinergistik dalam mengeliminasi parasit secara total (Charunwatthana, 2011). Pendekatan kombinasi fitokimia-obat sintesis ini juga sejalan dengan tren global pengembangan antimalaria

terkini. Studi yang menguji kombinasi ekstrak *Gymnema inodorum* dengan dihidroartemisinin melaporkan sinergi pada rasio tertentu dan memberikan perlindungan jangka panjang pada model *P. berghei* (Duangsri *et al.*, 2022). Demikian pula, Hermanto *et al.* (2023) melaporkan bahwa kombinasi apigenin dan asam ursolat mampu mengurangi keparahan malaria serebral pada model mencit Swiss Webster yang terinfeksi *P. berghei* ANKA model yang identik dengan yang digunakan dalam penelitian ini melalui mekanisme imunomodulator yang menekan respons inflamasi berlebihan. Temuan ini menambah dimensi baru pada profil manfaat asam ursolat dalam konteks terapi malaria, yang tidak hanya bersifat antiparasitik langsung, tetapi juga protektif terhadap komplikasi. Lebih jauh, perkembangan terkini dalam derivatisasi asam ursolat semakin memperkuat relevansi senyawa ini sebagai kerangka molekul (*scaffold*) dalam desain dan pengembangan obat antimalaria generasi baru. Abadia *et al.* (2025) melaporkan bahwa LAFIS10, sebuah derivat piperazinil dari asam ursolat, menunjukkan aktivitas antimalaria *in vivo* yang menjanjikan dengan profil toksikologi yang dapat diterima.

Temuan ini menunjukkan bahwa asam ursolat tidak hanya menarik sebagai senyawa alam dalam bentuk aslinya, tetapi juga sebagai kerangka molekul (*scaffold*) untuk pengembangan obat antimalaria generasi baru yang lebih poten dan selektif.

Meskipun penelitian ini membuktikan efikasi supresif total kombinasi oral klorokuin dan asam ursolat, studi ini terbatas pada penggunaan strain *Plasmodium berghei* ANKA yang masih sensitif klorokuin sebagai bukti awal penemuan ilmiah. Penentuan sifat sinergisme juga baru didasarkan pada persentase hambatan pertumbuhan parasit ekuivalen dan belum menerapkan analisis kuantitatif *Combination Index* (CI) Chou-Talalay. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini memberikan bukti *in vivo* pertama bahwa kombinasi sistematis klorokuin dan asam ursolat murni dalam sediaan oral dapat mencapai efektivitas setara monoterapi klorokuin dengan dosis klorokuin yang lebih rendah, menjadikan kombinasi ini kandidat yang sangat layak untuk dieksplorasi lebih lanjut dalam rangka pengembangan strategi antimalaria baru.

KESIMPULAN

Penelitian ini mengkonfirmasi bahwa kombinasi klorokuin dan asam ursolat menunjukkan aktivitas antimalaria sinergis yang signifikan terhadap *Plasmodium berghei* ANKA, dengan formula terbaik (klorokuin 15 mg/kg BB dan asam ursolat 12,5 mg/kg BB) mampu mencapai 100% hambatan pertumbuhan parasit. Keberhasilan mencapai efektivitas maksimal dengan dosis klorokuin 25% lebih rendah dibandingkan monoterapi membuktikan potensi asam ursolat sebagai agen komplementer yang menjanjikan. Sebagai langkah lanjut, diperlukan analisis kuantitatif menggunakan metode *Combination Index* Chou-Talalay, uji efikasi pada strain resisten klorokuin serta *P. falciparum* secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadia, J., Arango, G. J., Cardona-G, W., Lopera, V., Robledo, S., & Muñoz, D. L. (2025). In vivo antimalarial activity and toxicological profile of LAFIS10, a piperazine derivative from ursolic acid. *Tropical Medicine & International Health*.
<https://doi.org/10.1111/tmi.70115>
- Asanga, E. E., Ekpo, N. D., Edeke, A. A., Ekeleme, C. M., Okoroiwu,

- H. U., Edet, U. O., & Ettaba, M. (2024). Betulinic and ursolic acids from *Nauclea latifolia* roots mediate their antimalarial activities through docking with PfEMP-1 and PfPKG proteins. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04324-x>
- Bankole, D. A., Awodele, O., Oshikoya, K. A., & Oreagba, I. A. (2020). *Markhamia tomentosa* enhanced the antimalarial activity of chloroquine and amodiaquine in chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* infected mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112416. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112416>
- Charunwatthana, P., & Pukrittayakamee, S. (2011). Combination anti-malarial therapy and WHO recommendations. *The Journal of the Royal Institute of Thailand*, 2(1).
- Coronado, L. M., Nadovich, C. T., & Spadafora, C. (2014). Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1840(6), 2032–2041. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.009>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and disease. *Cell*, 167(3), 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- de Medeiros, D. S., Cargnin, S. T., Azevedo dos Santos, A. P., Rodrigues, M. S., ... & Gnoatto, S. C. B. (2021). Ursolic and betulinic semisynthetic derivatives show activity against CQ-resistant *Plasmodium falciparum* isolated from Amazonia. *Chemical Biology & Drug Design*, 97(5), 1038–1047. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13835>
- de Souza, G. E., Bueno, R. V., de Souza, J. O., Pinheiro, S. R., Guido, R. V. C., & Oliva, G. (2019). Antiplasmodial profile of selected compounds from Malaria Box: In vitro evaluation, speed of action and drug combination studies. *Malaria Journal*, 18(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3069-3>
- Dondorp, A. M., Fairhurst, R. M., Slutsker, L., Macarthur, J. R., Breman, J. G., Guerin, P. J., & Plowe, C. V. (2011). The threat of artemisinin-resistant malaria. *New England Journal of Medicine*, 365(12), 1073–1075. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1108322>
- Duangstri, S., Jaisamut, P., Wanna, W., & Chusri, S. (2022). Antimalarial potential of *Gymnema inodorum* leaf extract and dihydroartemisinin combination against *Plasmodium berghei* infected mice. *Research Square Preprint*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1520692/v2>
- Hermanto, F., Sutjiatmo, A. B., Subarnas, A., Haq, F. A., & Berbudi, A. (2023). The combination of apigenin and ursolic acid reduces the severity of cerebral malaria in *Plasmodium berghei* ANKA-infected Swiss Webster mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(1), 141–147.

- Ibraheem, Z. O. (2017). Antiplasmodium and chloroquine resistance reversing effects of selected pure phytochemicals. *International Journal of Pharmacology*, 13(5), 522–531. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.522.531>
- Mlala, S., Oyedeji, A. O., Gondwe, M., & Oyedeji, O. O. (2019). Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. *Molecules*, 24(15), 2751. <https://doi.org/10.3390/molecules24152751>
- Ndwammbi, A. A. T., Dongola, T. H., Shonhai, A., Zininga, T., & Muthusamy, R. (2024). Ursolic acid acetate and iso-mukaadial acetate bind to *Plasmodium falciparum* Hsp90, abrogating its chaperone function in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 297(7), 5179–5192. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-02944-9>
- Osei, K. A., Anning, A. K., Twumasi, M. A., Antwi-Agyei, P., & Owusu-Mensah, E. (2021). Xylopic acid-amodiaquine and xylopic acid-artesunate combinations are effective in managing malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Malaria Journal*, 20(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03830-2>
- Idem (Peters, W.). (1975). The chemotherapy of rodent malaria, XXII: The value of drug-resistant strains of *Plasmodium berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 69(2), 155–171. <https://doi.org/10.1080/00034983.1975.11686997>
- Sibiya, H., Mabandla, M. V., & Musabayane, C. T. (2016). The effects of transdermally delivered oleanolic acid on malaria parasites and blood glucose homeostasis in *P. berghei*-infected male Sprague-Dawley rats. *PLOS ONE*, 11(12), e0167132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167132>
- World Health Organization. (2023). *World malaria report 2023*. World Health Organization. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>