

EUGENOL MENGHAMBAT MOTILITAS *Salmonella* Typhi: STUDI *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

EUGENOL INHIBITS *Salmonella* Typhi's MOTILITIES: *IN VITRO* AND *IN SILICO* STUDIES

Ratna Yuliani^{1*}, Aqila Maiquina¹, Broto Santoso²

¹Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Sukoharjo, Indonesia

²Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Sukoharjo, Indonesia

*E-mail korespondensi : ratna.yuliani@ums.ac.id

Dikirim : 9 Mei 2026, Disetujui : 30 Mei 2026, Diterbitkan : 31 Mei 2026

Abstrak

Motilitas merupakan salah satu faktor virulensi bakteri yang berperan penting dalam menyebabkan penyakit. Oleh karena itu, motilitas bakteri perlu dihambat untuk menurunkan virulensinya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimotilitas eugenol terhadap motilitas *swimming* dan *swarming* *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) secara *in vitro* dan *in silico*. Aktivitas antibakteri eugenol diuji terhadap S. Typhi menggunakan metode mikrodilusi cair. Hasil dari uji tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi eugenol untuk uji antimotilitas. Aktivitas antimotilitas eugenol diuji terhadap motilitas *swimming* dan *swarming* menggunakan media Luria Bertani yang mengandung agar berturut-turut sebanyak 0,3 dan 0,5%. Uji *in silico* dilakukan menggunakan perangkat lunak SeeSAR (12.1.0) dan PyRx (1.0) dan aplikasi daring yaitu PSICHIC, Boltz2, DiffDock, Gnina, dan Smina (Tamarind-bio). Pada uji tersebut beberapa protein yang terlibat dalam motilitas digunakan sebagai protein target. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eugenol mempunyai aktivitas antibakteri terhadap S. Typhi dengan konsentrasi hambat minimum sebesar 1 mg/mL dan konsentrasi bunuh minimum sebesar lebih dari 1 mg/mL. Eugenol pada konsentrasi 0,5 dan 1 mg/mL mampu menghambat motilitas *swimming* dan *swarming* S. Typhi sebesar 100%. Hasil uji *in silico* menunjukkan bahwa eugenol diduga berikatan lebih kuat terhadap protein MotA dan menunjukkan aktivitas antagonis. Oleh karena itu, eugenol kemungkinan dapat digunakan sebagai agen antivirulen terhadap S. Typhi dan terapi kombinasi dengan antibiotik.

Kata Kunci: *swimming*, *swarming*, eugenol, S. Typhi

Abstract

Motility is one of the bacterial virulence factors that plays an important role in causing disease. Therefore, bacterial motility needs to be inhibited to reduce its virulence. This study aimed to evaluate the antimotility activity of eugenol against the swimming and swarming motility of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) through *in vitro* and *in silico* approaches. The antibacterial activity of eugenol against S. Typhi was tested using the broth microdilution method. The results of this test were used to determine the concentrations of eugenol for the antimotility assay. The antimotility activity of eugenol on swimming and swarming motility was tested using Luria-Bertani medium containing 0.3% and 0.5% agar, respectively. The *in silico* study was conducted using SeeSAR (12.1.0) and

PyRx (1.0) software, as well as online tools including PSICHIC, Boltz2, DiffDock, Gnina, and Smina (Tamarind-bio). Several proteins involved in motility were used as target proteins in this analysis. The results showed that eugenol exhibited antibacterial activity against *S. Typhi*, with a minimum inhibitory concentration of 1 mg/mL and a minimum bactericidal concentration of greater than 1 mg/mL. Eugenol at concentrations of 0.5 and 1 mg/mL was able to inhibit 100% of both swimming and swarming motility in *S. Typhi*. The *in silico* test results indicate that eugenol is predicted to bind more strongly to the MotA protein and exhibit antagonistic activity. Therefore, eugenol may potentially be used as an antivirulence agent against *S. Typhi* and as part of combination therapy with antibiotics.

Keywords: swimming, swarming, eugenol, *S. Typhi*

PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi umum dan masih banyak terjadi terutama di negara dengan pendapatan rendah (Liu *et al.*, 2025). Demam tersebut disebabkan oleh *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), patogen yang menyerang manusia dan dapat menginvasi dari saluran pencernaan ke darah. Bakteri tersebut dapat bertahan, bereproduksi di dalam makrofag, dan 1-4% kasus menjadi infeksi kronis. Tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella* diperkirakan menyebabkan kematian lebih dari 135.000 per tahun (Hoffman & Luby, 2024). *Salmonella Typhi* mengekspresikan beberapa faktor virulensi diantaranya kapsul, protein membran luar, flagela, fimbria, sistem sekresi tipe III, racun, faktor pengatur, dan plasmid virulen. Faktor-faktor virulensi tersebut membantu *S. Typhi* untuk bertahan di dalam makrofag dengan memediasi beberapa proses yaitu adhesi, invasi, pengambilan makanan, menghindari sistem imun yang pada akhirnya menyebabkan infeksi sistemik (Guo *et al.*, 2025).

Salmonella Typhi mampu bergerak dengan jenis motilitas *swimming* dan *swarming*. Motilitas *swimming* mempunyai peran penting dalam invasi sistemik di dalam inang (Chelvam *et al.*, 2014). *Swarming* merupakan gerakan bakteri di atas media. Motilitas ini dapat meningkatkan penempelan bakteri pada inang dan kolonisasi pada berbagai organisme. Selain itu, bakteri yang dapat bergerak mampu membawa spesies bakteri non-motil sehingga bakteri dapat menyebar. Oleh karena motilitas berkontribusi pada virulensi bakteri, maka motilitas dapat digunakan sebagai target untuk mencegah atau mengobati penyakit infeksi (Rütschlin & Böttcher, 2020). Bahan alam dapat dieksplorasi aktivitasnya sebagai antimotilitas bakteri, contohnya eugenol.

Eugenol (4-alil-2-metoksifenol) merupakan senyawa yang terkandung pada beberapa tanaman seperti cengkeh (*Eugenia caryophyllata*), kunyit (*Curcuma longa*), dan jahe (*Zingiber officinale*). Eugenol telah dilaporkan mempunyai beberapa aktivitas farmakologi antara lain antikanker, antioksidan, antidiabetes, antiparasit, antijamur, antiradang, dan antibakteri. Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas antibakteri eugenol terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Staphylococcus aureus* (Nisar *et al.*, 2021). Sejauh ini, uji aktivitas antimotilitas eugenol terhadap *S. Typhi* yang dilakukan secara *in vitro* sekaligus *in silico* belum pernah dilakukan.

Pada penelitian ini, aktivitas antimotilitas eugenol diuji terhadap motilitas *swimming* dan *swarming* *S. Typhi* menggunakan media dengan konsentrasi agar yang rendah. Uji *in silico*

dilakukan untuk memprediksi interaksi antara eugenol dengan protein yang terlibat dalam motilitas.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik (Ohaus), *laminar air flow* (LAF) (CV. Srikandi Laboratory), mikropipet (Socorex), inkubator (Mettler), autoklaf (Hirayama), dan oven (Mettler). Aplikasi yang digunakan: lokal SeeSAR versi 12.0.1, PyRx-Vina versi 1.0 dan keduanya dalam lingkungan sistem operasi Linux, PLIP untuk macOS conda versi 3.0.0, dan aplikasi daring yang digunakan yaitu PSICHIC, Boltz2, DiffDock, Gnina, dan Smina (Tamarind-bio).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eugenol (E51791, Sigma-Aldrich), *6-well plate* (Servicebio), *96-well plate* (Servicebio), *nutrient agar* (NA) (M001, Himedia), *Mueller Hinton broth* (MHB) (M391, Himedia), dimetil sulfoksida (DMSO) (1.02952.2500, Merck), resazurin (R7017, Sigma-Aldrich), Luria Bertani (LB) *broth* (M1245, Himedia), D-glukosa (1.08337.100, Merck), *agar bacteriological* (LP0011B, Oxoid), NaCl (K48328204 648, Merck), akuades, dan *S. Typhi* (dari Fakultas Farmasi, UMS). Berkas ligan (sdf) yang digunakan diperoleh dari basis data PubChem sedangkan berkas protein (pdb) diunduh dari basis data Uniprot dengan nomor Q8Z5R4, P0A1K0, Q8Z5R5, A0A751GPW4, dan Q8Z5U7. Kedua jenis berkas ini langsung digunakan pada SeeSAR dan Vina.

Prosedur penelitian

Uji aktivitas antibakteri

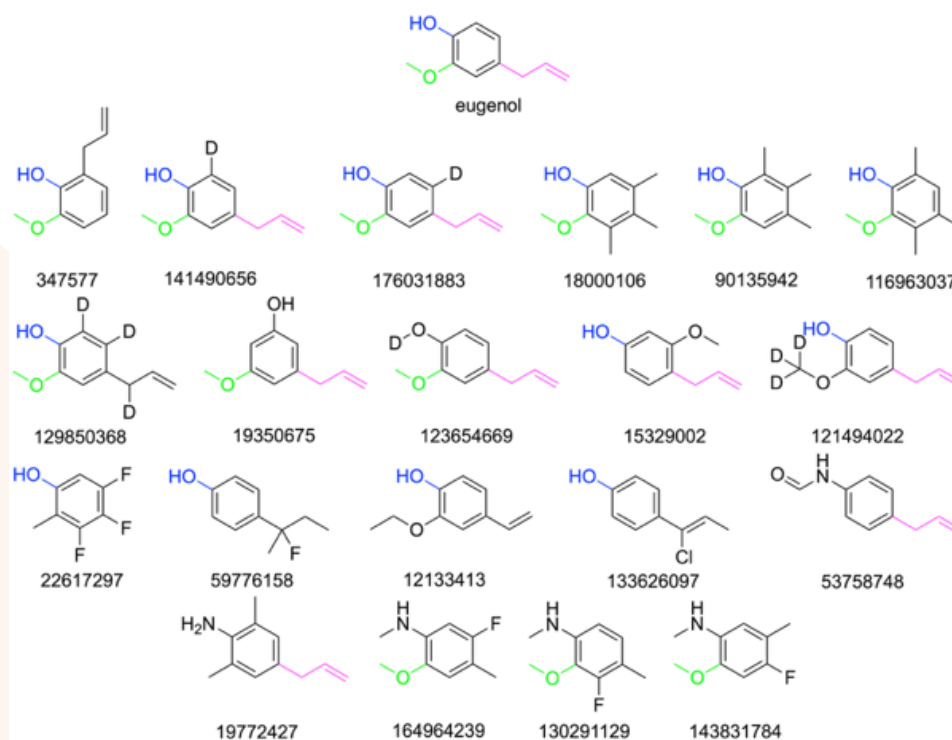
Aktivitas antibakteri eugenol terhadap *S. Typhi* diuji menggunakan metode mikrodilusi cair menurut Balouri *et al.* (2016) dengan modifikasi. Eugenol yang dilarutkan dalam DMSO diencerkan dalam MHB di *96-well plate* sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031; 0,016; 0,008; 0,004; dan 0,002 mg/mL pada sumuran nomor 1-10. Dimetil sulfoksida sebagai kontrol pelarut juga diencerkan sehingga diperoleh rentang konsentrasi 2,5-0,005%. Sumuran nomor 11 digunakan sebagai kontrol pertumbuhan, sedangkan sumuran nomor 12 digunakan sebagai kontrol sterilitas. Suspensi *S. Typhi* dalam MHB dengan konsentrasi sebesar 10^6 CFU/mL ditambahkan ke dalam sumuran nomor 1-11. Selanjutnya, *plate* diinkubasi selama 20-24 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, 10 µL resazurin 1 mg/mL ditambahkan ke dalam semua sumuran dan *plate* diinkubasi selama 2 jam. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ditentukan dari konsentrasi terkecil eugenol yang tidak menyebabkan perubahan warna dari biru ke merah muda. Setelah KHM ditentukan, sebanyak 50 µL cairan dalam sumuran yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri diambil dan diratakan pada media NA lalu diinkubasi selama semalam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditentukan dari konsentrasi yang menghambat 99,9% bakteri dari inokulum awal (Qaiyumi, 2007). Uji aktivitas antibakteri dilakukan sebanyak 3 kali.

Uji aktivitas antimotilitas

Aktivitas antimotilitas eugenol diujikan terhadap motilitas *swimming* dan *swarming* pada *S. Typhi*. Uji dilakukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Rattanachak *et al.* (2022) yang dimodifikasi. Media LB yang ditambah agar sebanyak 0,3% digunakan untuk uji *antiswimming* sedangkan media LB yang ditambah agar sebanyak 0,5% dan glukosa sebanyak 0,5% digunakan untuk uji *antiswarming*. Eugenol dicampur dengan media hangat sehingga konsentrasi eugenol sebesar KHM, $\frac{1}{2}$ KHM, dan $\frac{1}{4}$ KHM. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumuran pada *6-well plate*. Media tanpa eugenol dimasukkan ke dalam 2 sumuran lain sebagai kontrol sterilitas dan kontrol motilitas. Media yang ditambah DMSO juga dimasukkan ke sumuran sebagai kontrol pelarut. Setelah media memadat, 2 μ L suspensi *S. Typhi* dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL diinokulasikan di dalam media pada uji *antiswimming* dan ditetaskan di atas permukaan media pada uji *antiswarming*. Media sebagai kontrol sterilitas tidak ditanami bakteri. Selanjutnya, *6-well plate* tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diameter motilitas *S. Typhi* diukur menggunakan penggaris. Uji aktivitas antimotilitas dilakukan sebanyak 3 kali dan hasil uji dirata-rata.

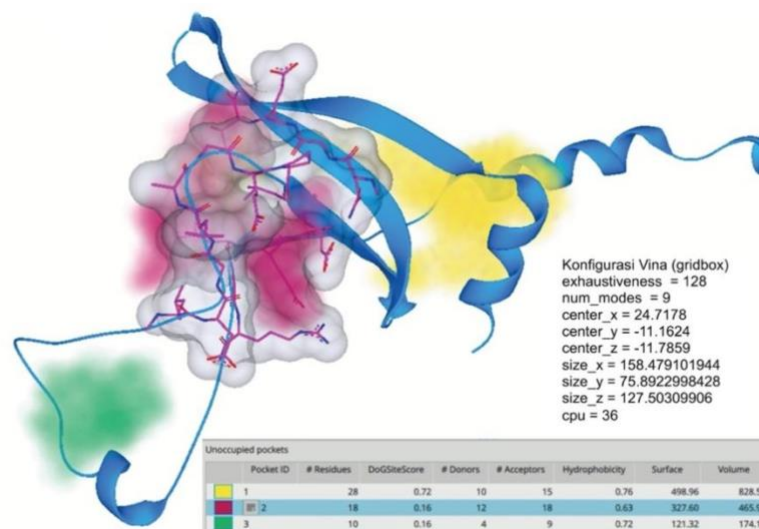
Uji *in silico*

Semua proses komputasi dikerjakan menggunakan komputer berbasis Linux dengan 48 inti prosesor dan memori 128 GB. Perangkat lunak lokal yang digunakan adalah SeeSAR (12.1.0) dan PyRx (1.0), sedangkan aplikasi daring yang dimanfaatkan yaitu PSICHIC, Boltz2, DiffDock, Gnina, dan Smina (Tamarind-bio).



Gambar 1. Struktur kimia eugenol dan kedua puluh senyawa dengan struktur mirip eugenol yang digunakan dalam uji *in silico* bersumber dari basis data PubChem. Angka di bawah struktur kimia merupakan *compound identification (CID)* dari senyawa pada basis data tersebut.

Berkas tiga dimensi (3D) senyawa eugenol diunduh dari basis data PubChem dengan CID3314 beserta 20 senyawa lainnya (Gambar 1) yang memiliki kemiripan dengan rangka struktur eugenol atas dasar deskriptor luas area permukaan polar, bobot molekul, jumlah *rotatable bond*, jumlah donor ikatan hidrogen, dan kompleksitas dari senyawa. Semua protein diunduh dalam satu berkas berekstensi sdf.



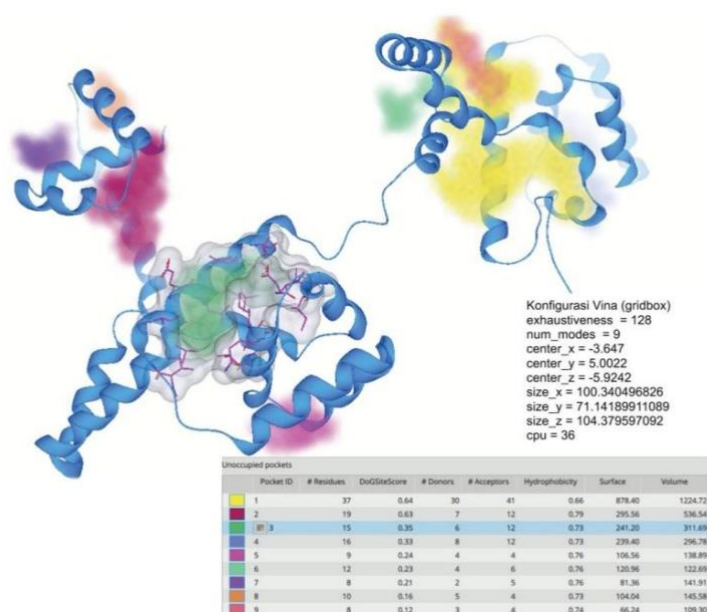
Gambar 2. Area pengikatan (*pocket*) protein *flagellar motor switch S. Typhi*. FliN (SeeSAR) dan konfigurasi gridbox Vina yang digunakan.

Protein yang digunakan untuk pengujian antimotilitas terhadap *S. Typhi* adalah *flagellar motor switch protein* yaitu FliN (Gambar 2), FliG (Gambar 3), dan FliM (Gambar 4), dan *flagellar motor stator protein* yaitu MotA (Gambar 5) dan MotB (Gambar 6 dan 7). Kelima berkas protein diunduh dari basis data Uniprot dengan kode yang secara berurutan adalah Q8Z5R4, P0A1K0, Q8Z5R5, A0A751GPW4, dan Q8Z5U7. Hanya protein P0A1K0 yang telah ditinjau oleh Uniprot. Terdapat 2 protein untuk kode uniprot Q8Z5U7 yang digunakan dalam uji *in silico* ini, yaitu MotB-1 dan MotB-2. Semua berkas merupakan hasil prediksi dari AlphaFold yang tersedia dalam basis data Uniprot.

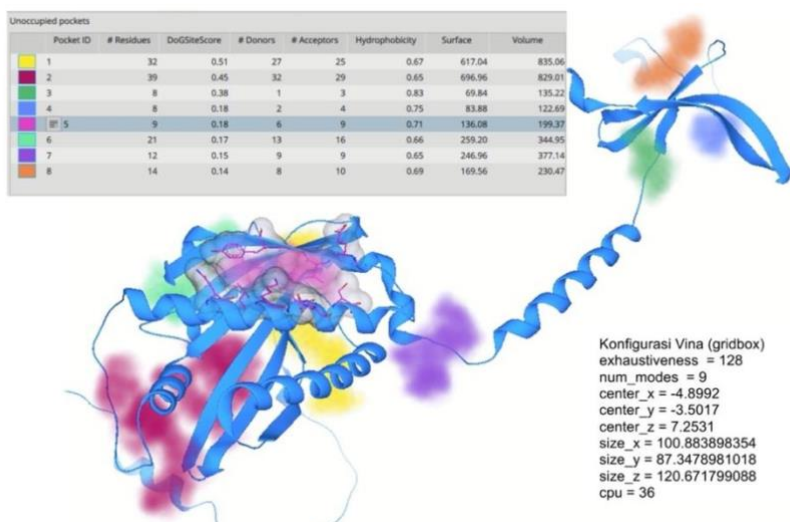
Prosedur penambatan molekuler (*Docking*)

AutoDock Vina

Berkas protein (pdb) dan ligan (sdf) dikonversi menjadi berkas pdbqt yang siap digunakan untuk uji *in silico* dengan bantuan PyRx dan OpenBabel. Proses penambatan molekuler berlangsung secara kontinu terhadap enam protein dan 21 ligan dengan nilai *exhaustiveness* diatur pada 128 dan area komputasi (gridbox) dibiarkan sesuai bawaan aplikasi (meliputi seluruh area dari protein) pada titik pusat protein dengan jumlah 9 konformer terbaik.



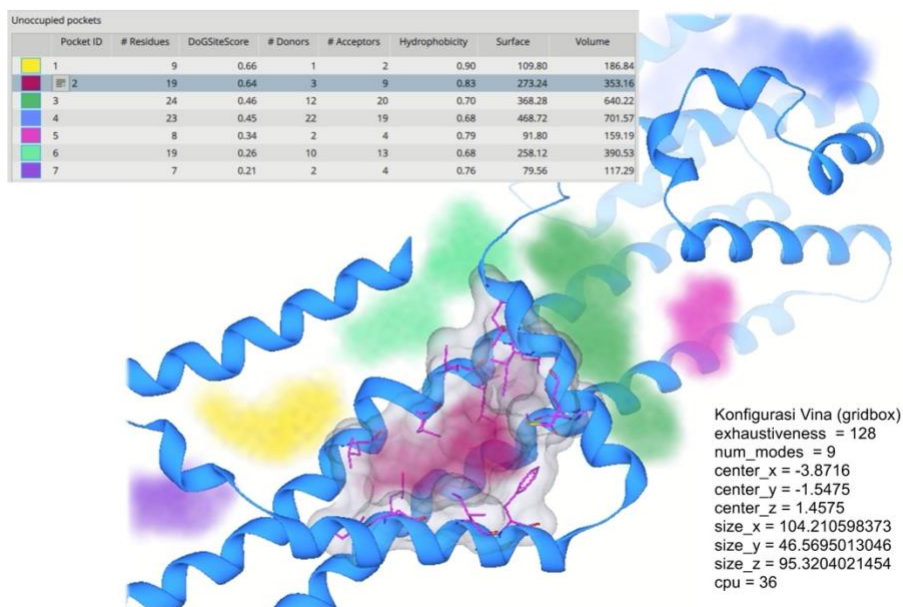
Gambar 3. Area pengikatan (*pocket*) protein *flagellar motor switch S. Typhi*. FliG (SeeSAR) dan konfigurasi gridbox Vina yang digunakan.



Gambar 4. Area pengikatan (*pocket*) protein *flagellar motor switch S. Typhi*. FliM (SeeSAR) dan konfigurasi gridbox Vina yang digunakan.

SeeSAR

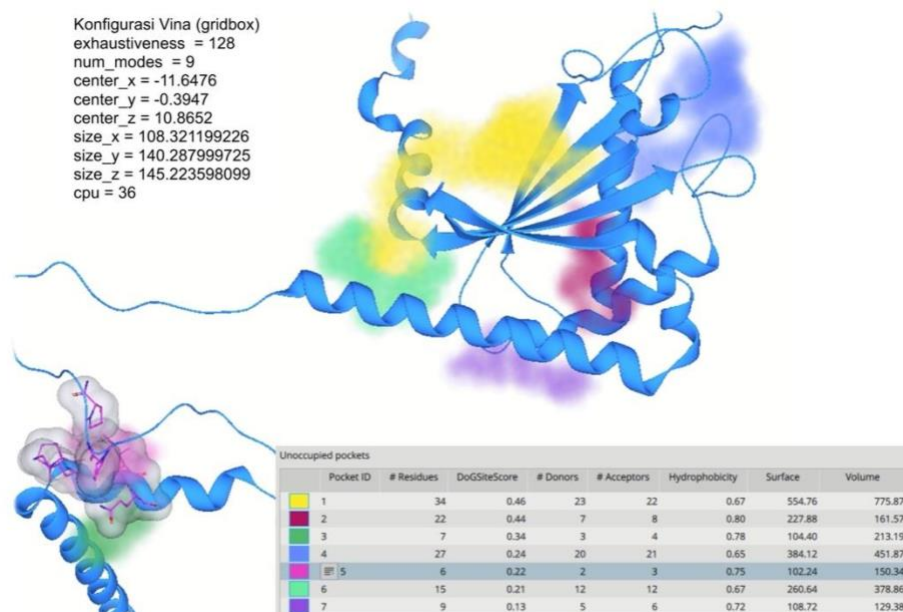
Berkas protein (pdb) yang telah dimuat ke dalam aplikasi, ditentukan *binding site* (jika luas permukaan mendekati atau lebih dari 100 Å²) yang akan digunakan seperti yang ditampakkan dalam Gambar 2-7 dan ligan dimuat melalui menu Docking Mode untuk memulai penambatan molekuler standar dan mendapatkan nilai rentang *predicted IC*₅₀.



Gambar 5. Area pengikatan (*pocket*) protein *flagellar motor stator S. Typhi. MotA* (SeeSAR) dan konfigurasi gridbox Vina yang digunakan.

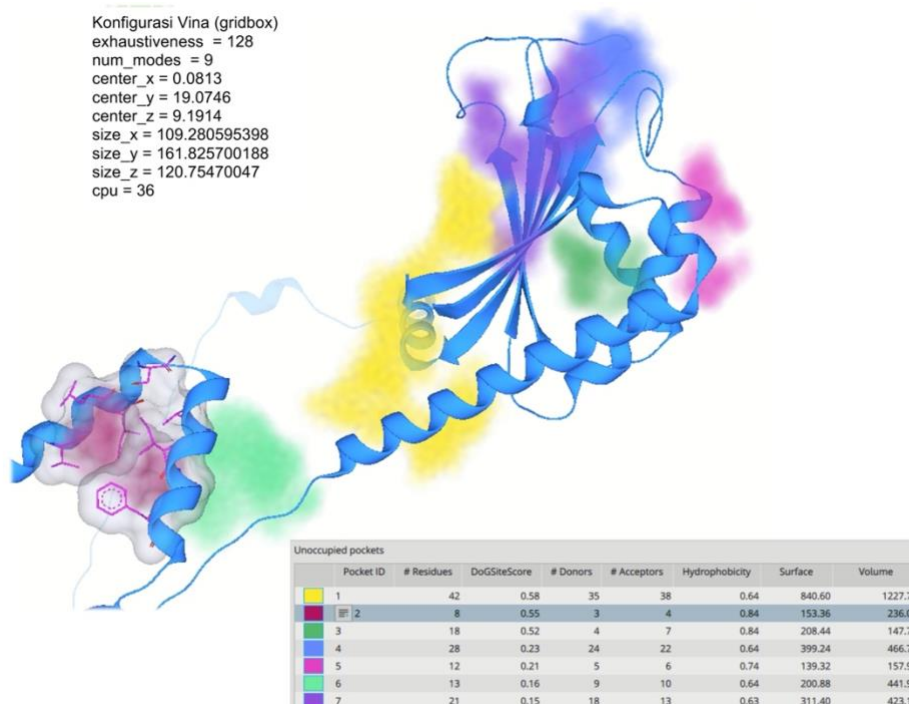
Peladen PSICHIC

Urutan sekuen kelima protein dan kode SMILES dari 21 ligan uji diunggah pada PSICHIC di alamat <https://www.psichicserver.com/>. Hasil pengukuran dapat diunduh berupa berkas csv dan atom penting dalam interaksi ligan protein ditampilkan pada laman hasil PSICHIC.



Gambar 6. Area pengikatan (*pocket*) protein *flagellar motor stator S. Typhi. MotB-1* (SeeSAR) dan konfigurasi gridbox Vina yang digunakan.

Peladen Boltz2, DiffDock, Gnina, dan Smina. Selain Boltz2 dan Smina, aplikasi DiffDock dan Gnina hanya dikerjakan untuk sekuens protein MotA dan SMILES dari eugenol. Penambatan molekuler dilakukan pada portal Tamarinds-bio di alamat <https://app.tamarind.bio/>. Hasil dapat diunduh dalam bentuk berkas terkompresi zip.



Gambar 7. Area pengikatan (pocket) protein *flagellar motor stator S. Typhi. MotB-2* (SeeSAR) dan konfigurasi gridbox Vina yang digunakan

Analisis data

Data hasil uji aktivitas antibakteri berupa KHM dan KBM tidak dianalisis secara statistik. Data hasil uji aktivitas antimotilitas disajikan dalam bentuk persentase penghambatan yang dihitung menggunakan rumus (1).

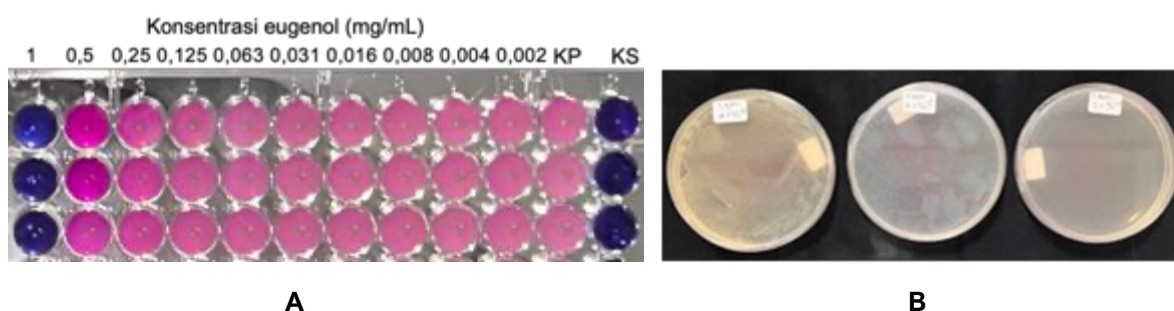
$$\text{Penghambatan motilitas (\%)} = \frac{\text{diameter motilitas pada kontrol pelarut} - \text{diameter motilitas pada perlakuan}}{\text{diameter motilitas pada kontrol pelarut}} \times 100 \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antibakteri eugenol

Aktivitas antibakteri eugenol terhadap *S. Typhi* diuji menggunakan metode mikrodilusi cair. Pada akhir uji, resazurin ditambahkan ke dalam sumuran untuk memudahkan penentuan KHM. Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on 10-oksida) merupakan bahan pewarna biru yang dapat direduksi oleh enzim oksidoreduktase pada bakteri yang aktif menjadi resorufin yang berwarna merah muda dan dapat berfluoresensi. Oleh karena itu, resazurin dapat digunakan untuk mengukur aktivitas metabolisme bakteri dan digunakan untuk menentukan KHM (Chakansin *et al.*, 2022).

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa eugenol pada konsentrasi tertentu mampu menghambat pertumbuhan *S. Typhi* (Gambar 8A). Sumuran yang berisi eugenol pada konsentrasi 1 mg/mL dan kontrol sterilitas tetap berwarna biru yang mengindikasikan bahwa pertumbuhan bakteri pada sumuran tersebut dihambat atau tidak ada. Sumuran dengan konsentrasi eugenol dibawah 1 mg/mL, sumuran yang berisi DMSO, dan kontrol pertumbuhan berwarna merah muda. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam sumuran tersebut ada bakteri yang tumbuh. Berdasarkan hasil tersebut, DMSO yang digunakan sebagai pelarut ekstrak tidak mempengaruhi pertumbuhan *S. Typhi* sedangkan eugenol mampu menghambat pertumbuhan *S. Typhi* dengan KHM sebesar 1 mg/mL. Nilai KBM ditentukan dengan menanam cairan dalam sumuran yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri pada media NA. Hasil menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang banyak pada media NA (Gambar 8B). Hal tersebut mengindikasikan bahwa eugenol pada konsentrasi 1 mg/mL belum dapat membunuh *S. Typhi*. Nilai KBM eugenol terhadap *S. Typhi* diperkirakan lebih besar dari 1 mg/mL.



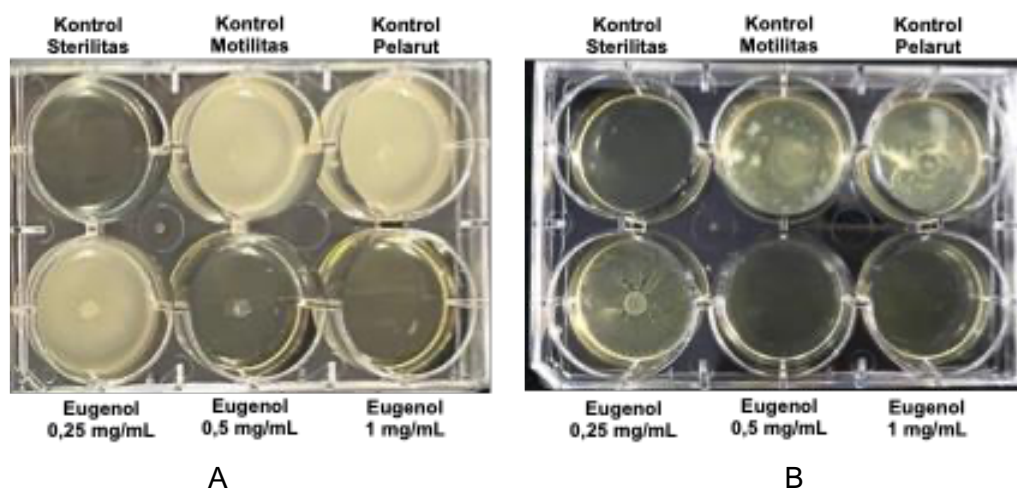
Gambar 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri eugenol. A. KHM eugenol terhadap *S. Typhi* sebesar 1 mg/mL. KP: kontrol pertumbuhan, KS: kontrol sterilitas. B. Hasil kultur dari sumuran yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri. Konsentrasi bunuh minimum eugenol sebesar > 1 mg/mL.

Aktivitas antibakteri eugenol terhadap *S. Typhi* juga telah dilaporkan oleh Devi *et al.* (2010). Pada penelitian tersebut, eugenol menghambat *S. Typhi* dengan KHM sebesar 0,0125% dan KBM sebesar 0,025%. KHM dan KBM tersebut berturut-turut setara dengan 0,125 mg/mL dan 0,25 mg/mL. Nilai tersebut jauh lebih kecil dibandingkan dengan KHM dan KBM hasil penelitian ini. Perbedaan hasil kemungkinan disebabkan oleh perbedaan pelarut untuk melarutkan eugenol. Penelitian ini menggunakan DMSO untuk melarutkan eugenol dan DMSO pada konsentrasi yang diujikan tidak mempunyai efek terhadap pertumbuhan *S. Typhi*. Devi *et al.* (2010) melarutkan eugenol dalam metanol yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Metanol kemungkinan berkontribusi terhadap efek antibakteri eugenol sehingga nilai KHM dan KBM eugenol lebih rendah.

Aktivitas antimotilitas eugenol

Patogenesis bakteri dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor virulensi, salah satunya motilitas bakteri (Sultan *et al.*, 2021). Oleh karena itu, motilitas bakteri dapat digunakan sebagai target antivirulen untuk menghilangkan kemampuan bakteri dalam menyebabkan penyakit (Li *et al.*, 2025). Pada penelitian ini, eugenol diuji aktivitas antimotilitasnya terhadap motilitas

swimming dan *swarming* pada *S. Typhi*. Konsentrasi eugenol yang digunakan untuk uji didasarkan pada hasil uji aktivitas antibakteri. Konsentrasi eugenol 1 mg/mL dapat menghambat pertumbuhan *S. Typhi* tetapi tidak dapat membunuhnya, sehingga konsentrasi tersebut digunakan sebagai konsentrasi tertinggi untuk uji antimotilitas. Konsentrasi lain menggunakan konsentrasi dibawah KHM yaitu $\frac{1}{2}$ KHM (0,5 mg/mL) dan $\frac{1}{4}$ KHM (0,25 mg/mL).



Gambar 9. Eugenol menghambat motilitas *S. Typhi*. A. Hasil uji *antiswimming* eugenol terhadap *S. Typhi*. Eugenol pada konsentrasi 0,5 dan 1 mg/mL mampu menghambat motilitas *swimming* *S. Typhi*. B. Hasil uji *antiswarming* eugenol terhadap *S. Typhi*. Eugenol pada konsentrasi 0,5 dan 1 mg/mL mampu menghambat motilitas *swarming* *S. Typhi*.

Hasil uji antimotilitas eugenol menunjukkan bahwa senyawa tersebut mampu menghambat motilitas *swimming* dan *swarming* *S. Typhi*. Pada hasil uji *antiswimming* (Gambar 9A), *S. Typhi* mampu bergerak sampai ke pinggir sumuran pada kontrol motilitas, kontrol pelarut, dan media dengan konsentrasi eugenol sebesar 0,25 mg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa DMSO sebagai pelarut ekstrak dan eugenol pada konsentrasi tersebut tidak menghambat motilitas *swimming* *S. Typhi*. Ketika konsentrasi eugenol ditingkatkan menjadi 0,5 mg/mL, motilitas *swimming* *S. Typhi* menurun tajam dan eugenol menghambat motilitas *swimming* sebesar 89,5%. Motilitas *swimming* *S. Typhi* hilang sama sekali ketika bakteri tersebut dipapar eugenol pada konsentrasi 1 mg/mL. Sumuran dengan konsentrasi eugenol tertinggi tidak terlihat adanya motilitas bakteri sehingga dapat dikatakan bahwa eugenol pada konsentrasi 1 mg/mL menghambat *swimming* *S. Typhi* sebesar 100%.

Hasil uji *antiswarming* menunjukkan bahwa eugenol mampu menghambat motilitas *swarming* *S. Typhi*. Bakteri tersebut dapat bergerak di atas media pada kontrol motilitas, kontrol pelarut, dan media yang mengandung eugenol 0,25 mg/mL tanpa ada hambatan (Gambar 9B). Tidak ada motilitas *swarming* *S. Typhi* yang dapat diamati pada media yang mengandung eugenol pada konsentrasi 0,5 dan 1 mg/mL. Hal ini mengindikasikan bahwa pada konsentrasi tersebut, eugenol mampu menghambat motilitas *swarming* *S. Typhi* sebesar 100%.

Motilitas bakteri yang difasilitasi oleh flagela berkontribusi terhadap virulensi bakteri. Motilitas bakteri diperlukan untuk mencapai tempat infeksi dan menyebar ke tempat infeksi yang lain (Chaban *et al.*, 2015). Mentargetkan motilitas bakteri merupakan paradigma baru

untuk mengembangkan agen antivirulen yang dapat melemahkan patogen dan meminimalkan *selective pressure* untuk resistensi. Agen antivirulen kemungkinan dapat digunakan dalam terapi kombinasi (Sun *et al.*, 2026). Hasil penelitian ini menunjukkan eugenol mampu menghambat *swimming* dan *swarming* *S. Typhi*. Penghambatan *swimming* memungkinkan eugenol untuk membatasi motilitas *S. Typhi* sehingga bakteri tersebut sulit untuk menjangkau sel atau jaringan target dan menyebar ke bagian lain. Selain itu, bakteri yang motilitasnya terhambat atau non-motil lebih mudah dikeluarkan dari dalam saluran pencernaan sebagaimana yang dilaporkan oleh Wiles *et al.* (2020). Eugenol yang mampu menghambat *swimming* *S. Typhi* diperkirakan dapat mempercepat eliminasi patogen tersebut dari usus sehingga perkembangan infeksi dapat dihindari. Selain *swimming*, eugenol juga menghambat *swarming* *S. Typhi*. *Swarming* merupakan gerakan bersama sekelompok bakteri pada permukaan. Bakteri dalam kondisi *swarming* mempunyai resistensi terhadap antibiotik sehingga penghambatan motilitas tersebut dapat menghilangkan fenotip resistensi bakteri (Irazoki *et al.*, 2017). Eugenol dengan konsentrasi 0,5 dan 1 mg/mL menghilangkan kemampuan *swarming* *S. Typhi*. Hal ini mengindikasikan bahwa eugenol kemungkinan dapat meningkatkan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa eugenol berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antivirulen yang dapat menekan penyebaran infeksi dan munculnya bakteri resisten terhadap antibiotik.

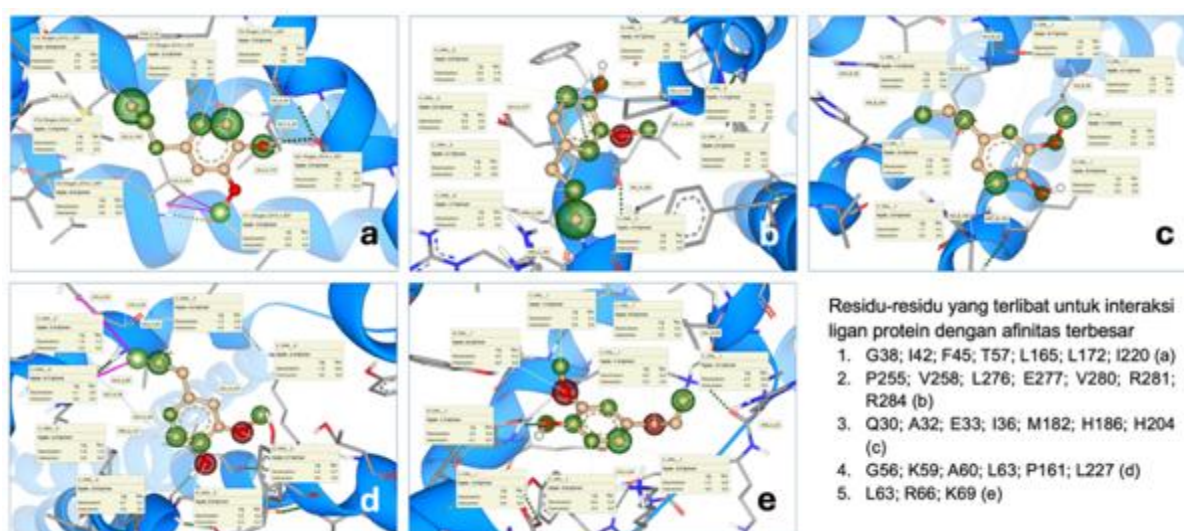
Selain uji *in vitro*, penambatan molekuler (*docking*) dilakukan untuk memperkirakan interaksi eugenol dengan protein-protein yang terlibat dalam motilitas *S. Typhi*. Ikatan eugenol dan protein target memiliki afinitas terbaik untuk protein MotA, 1,4 μ M (SeeSAR) atau -5,6 kkal/mol (Vina) dan terjadi peningkatan 3,6% setelah dilakukan penambatan molekuler secara fleksibel menggunakan AutoDock-vina (Tabel 1). Namun nilai ini masih sepersepuluh di bawah dari afinitas 2,6-dimetil-4-prop-2-enilanolin (CID-19772427), salah satu senyawa dengan kerangka yang mirip eugenol. Senyawa ini memiliki afinitas baik dikarenakan nilainya telah melebihi batas bawah, yaitu kurang dari -6,0 kkal/mol. Protein MotA diduga dapat mengikat kuat eugenol dibandingkan dengan protein target anti motilitas lainnya. Berdasarkan data hasil PSICHIC, eugenol dan senyawa yang mirip diprediksi tidak berikatan pada *flagellar motor switch protein* yang disandi oleh gen Fli dan *flagellar motor rotor protein* lainnya (MotB). Bahkan Boltz2 memperkirakan bahwa semua ligan tersebut diduga terikat dengan protein antimotilitas di kisaran $\pm 30\%$.

Hasil PSICHIC menunjukkan bahwa eugenol dapat terikat baik pada protein MotA sebagai antagonis dengan kemungkinan mencapai 52,9%. Walaupun nilai ini masih jauh di bawah dari kedelapan senyawa mirip eugenol lainnya, dimana nilai antagonis prediksinya telah mencapai lebih dari 90%. Secara konsisten, eugenol tidak memberikan nilai minimal untuk dikatakan memiliki afinitas ikatan baik atau kurang dari batas bawah berdasarkan nilai yang diperoleh dari Boltz2, Gnina, dan Smina (Tabel 1).

Tabel 1. Studi *in silico* eugenol terhadap motilitas *S. Typhi* menggunakan beberapa aplikasi penambatan molekuler yang berbeda

Parameter	FliN	FliG	FliM	MotA	MotB-1	MotB-2	FliN- flexVina	MotA- flexVina
Vina score [#]	-5,3	-4,9	-4,8	-5,6	-5,4	-5,3	-4,9	-5,8
SeeSAR lowest predicted IC ₅₀ (μM)	384,1 (p-01) 592,9 (p-02) 25,2 (p-03)	23,1 (p-03) 215,6 (p-04) 3,298,3 (p-05) 93,6 (p-07) 1,150,0 (p-08)	17,9 (p-01) 15,6 (p-04) 6,6 (p-05) 548,0 (p-06) 2.244,2 (p-07)	43,1 (p-01) 1,4 (p-02) 25,2 (p-03) 503,4 (p-04) 18,7 (p-05) 108,3 (p-06)	5.164,4 (p-01) 68,9 (p-03) 3.962,4 (p-04) 12,7 (p-05) 16,8 (p-06) 1.394,3 (p-07)	341,8 (p-01) 6,9 (p-02) 1.290,8 (p-04) 202,4 (p-05) 500,4 (p-06)	n.a.	n.a.
Boltz2 IC ₅₀ binding affinity [#] / confidence / binding probability	-6,31 / 0,82 / 0,29	-5,99 / 0,74 / 0,30	-5,42 / 0,79 / 0,20	-4,97 / 0,86 / 0,34	-4,69 / 0,71 / 0,24	n.a.*	n.a.	n.a.
DiffDock score [#] / confidence	n.p.	n.p.	n.p.	-2,07724 (-1,61)	n.p.	n.a.	n.a.	n.a.
Gnina score	n.p.	n.p.	n.p.	-4,99	n.p.	n.a.	n.a.	n.a.
Smina affinity [#]	-4,9	-4,9	-5,3	-5,5	-5,0	-4,5	n.a.	n.a.
Predicted binding affinity – pBA	4,4647145	4,378914	5,098860	6,734211	4,231716	n.a.	n.a.	n.a.
Predicted nonbinder (%) – pN	97,97	99,74	97,58	4,14	99,47	n.a.	n.a.	n.a.
Predicted antagonist (%) – pAt	0,27	0,26	0,89	52,88	0,53	n.a.	n.a.	n.a.
Predicted agonist (%) – pAg	1,76	0	1,52	41,42	0	n.a.	n.a.	n.a.
Senyawa mirip Eugenol: CID (Vina score, pBA, pN, pAt, pAg) dengan afinitas ikatan tertinggi	19772427 (-5,6; 4,501369; 93,68; 0 ; 2,64) 347577 (-5,6; 4,457967; 99,15; 0,43 ; 0,41)	133626097 (-5,4; 4,370322; 99,72; 0,27 ; 0) 22617297 (-5,4; 4,626232; 99,32; 0,67 ; 0) 59776158 (-5,4; 4,505473; 98,09; 1,91 ; 0)	12133413 (-4,9; 5,200770; 94,42; 1,76 ; 2,20)	19772427 (-6,1; 6,003152; 55,96; 17,27 ; 26,77) 116963037 (-5,5; 7,0995407; 0,09; 99,89 ; 0,02)	90135942 (-5,5; 4,469177; 98,64; 1,36 ; 0)	18000106; 19350675; 53758748; 90135942 (- 5,5; n.a.)	19772427 (-5,5; n.a.)	19772427 (-6,6; n.a.)

n.p.=tidak dilakukan; n.a.=tidak tersedia; p=nomor *binding pocket*; IC₅₀ *binding affinity* Boltz2, skor Vina, predicted IC₅₀ SeeSAR dikatakan baik jika nilai semakin negatif atau kecil, confidence dan binding probability baik jika mendekati 1; DiffDock, Gnina, Smina telah dikerjakan secara menggunakan *online Tamarind Bio's scoring function*. Gen= FliN, FliG, FliM, MotA, MotB; flexVina=Vina dengan beberapa residu fleksibel. *sequence MotB sama, [#](kkal/mol). Nilai pBA, pN, pAt, pAg diperoleh dari aplikasi *online PSICHIC*



Gambar 10. Interaksi eugenol dan protein (MotA) yang terdeteksi oleh SeeSAR berdasarkan struktur kompleks dari eugenol-MotA yang diperoleh dari penambatan molekuler menggunakan SeeSAR (a), Vina-rigid (b), DiffDock (c), Gnina (d), dan Smina (e). Warna hijau menandakan afinitas ikatan lebih baik (nilai makin negatif), sedangkan merah sebaliknya. Diameter bulatan menandakan interaksi makin baik ketika ukurannya meningkat.

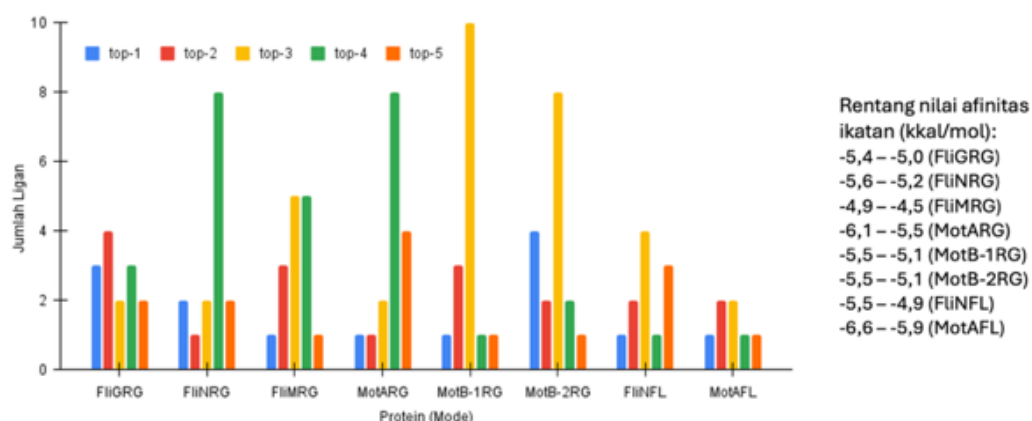
Beberapa residu yang terlibat pada interaksi ligan protein berhasil dideteksi SeeSAR untuk tiap kompleks protein ligan terbaik hasil penambatan molekuler Vina-rigid, DiffDock, Gnina, dan Smina (Gambar 10). Kompleks eugenol-MotA hasil *docking* Vina secara fleksibel dan Boltz2 tidak ditampilkan. Terdapat satu residu yang sama, Leusin63, pada hasil Gnina dan Smina. Prediksi interaksi hasil Vina-rigid memberikan residu penentu yang berbeda dengan keduanya, sama halnya dengan hasil SeeSAR dan DiffDock. Hal ini dikarenakan ligan berinteraksi pada *binding pocket* yang berbeda. *Docking* dengan SeeSAR telah diatur hanya terjadi pada *binding pocket* tertentu, dan yang terbaik adalah area pengikatan nomor urut 2. Selain asam amino P161 dan L227 dari Gnina, ketiga aplikasi lainnya mempunyai residu yang terlibat interaksi berbeda dengan residu penyusun area pengikatan SeeSAR. Perbedaan luas dan volume area pengikatan dan pusat massa yang ditentukan dan digunakan aplikasi diduga menjadi penyebab utama perbedaan nilai afinitas ikatan dan profil interaksinya.

Hasil penambatan molekuler menggunakan Boltz2 dan Vina-fleksibel tidak dapat dideteksi profil interaksi ligan proteinnya dikarenakan SeeSAR memberikan notifikasi bahwa jarak interaksi antar atom terlalu jauh dari jarak maksimal yang digunakan dan menjadi dasar penentu interaksi. Tabel 2 memperlihatkan profil residu protein yang berinteraksi dengan eugenol dari berbagai aplikasi penambatan molekuler yang telah digunakan. Interaksi melalui ikatan hidrogen ditemukan pada kompleks hasil SeeSAR, Vina, dan Smina. Jumlah dan tipe residu penting yang terlibat interaksi menunjukkan konformasi akhir kompleks ligan protein yang berbeda, walaupun penambatan molekuler telah diarahkan pada area pengikatan yang sama, seperti halnya SeeSAR dan Vina-fleksibel. Menariknya, Gnina menginfokan secara baik bahwa area pengikatan kompleks ligan protein hasil penambatan ikatan berada di area yang sama dengan SeeSAR dan Vina-fleksibel. Area pengikatan keempat kompleks lainnya diduga juga sama, namun residu yang terdeteksi belum bisa mewakili kesimpulan ini.

Tabel 2. Profil interaksi eugenol dan protein yang diperoleh dari aplikasi *Protein Ligand Interaction Profiler (PLIP)*

No.	Aplikasi	Interaksi hidrofobik (jarak dalam Å)	Ikatan hidrogen (jarak dalam Å)
1.	SeeSAR	I42 (3,31); F45 (3,54); T57 (3,55); L165 (3,53); V168 (3,41)	G38 (1,96-2,91)
2.	Vina-rigid	P255 (3,92; 3,69); F273 (3,91); E277 (3,62; 3,87)	E259 (2,36-3,09)
3.	Vina-fleksibel	I3 (3,72); I46 (3,87); I54 (3,73); P161 (3,97); L165 (1,08; 1,54); L211 (3,99); F219 (3,74); K230 (3,72)	S164 (2,88-3,77)
4.	Boltz2	R90 (3,60); L130 (3,34); L245 (3,68); L249 (3,77)	-
5.	DiffDock	A32 (3,81); H186 (3,92)	-
6.	Gnina	K59 (3,77); L63 (3,79); A158 (3,79); L227 (3,33)	-
7.	Smina	L63 (3,72); R66 (3,74); K69 (3,55); Y70 (3,82); K230 (3,81; 3,90)	Y70 (2,12-3,05); Y154 (3,37-4,08)

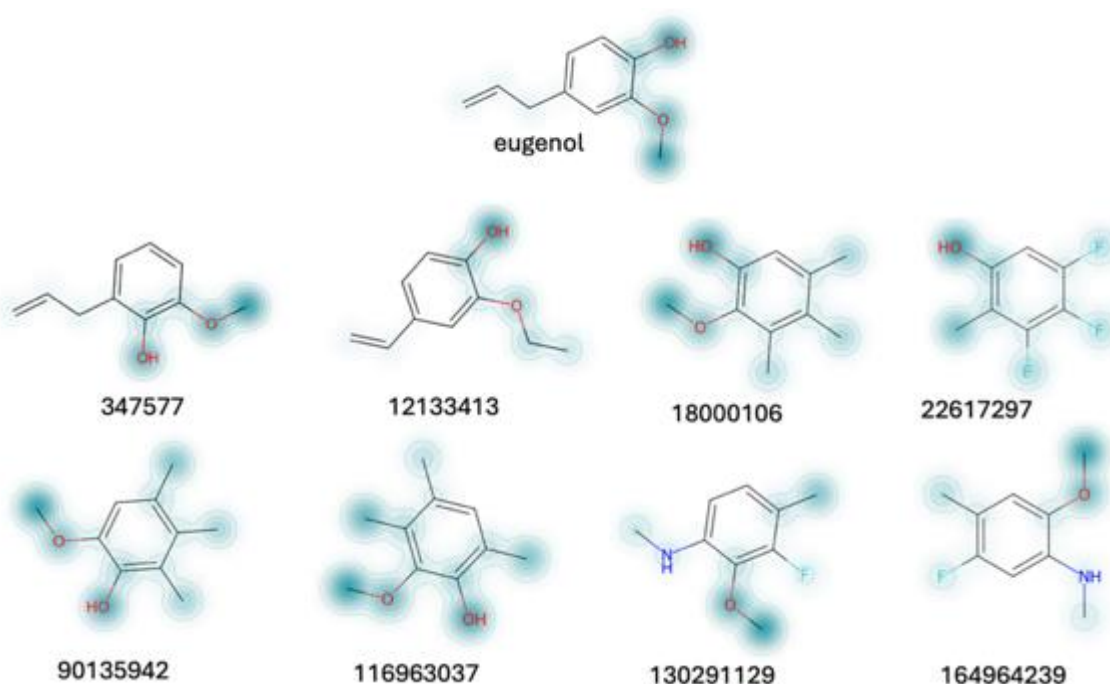
Cetak tebal adalah residu area pengikatan nomor 2 SeeSAR.



Gambar 11. Distribusi skor Vina untuk lima nilai afinitas tertinggi terhadap protein target.

Berdasarkan distribusi jumlah senyawa yang termasuk dalam kelompok lima nilai afinitas tertinggi terdapat protein target (Gambar 11) yang diperoleh menggunakan Vina, memperlihatkan bahwa mode fleksibel dapat menyaring hanya senyawa-senyawa yang dapat tertambat baik dengan residu yang dibuat fleksibel selama proses penambatan molekuler. Selain protein target dimana eugenol tidak terikat sebagai antagonis baik, nilai afinitas senyawa dan MotA pada Vina-fleksibel telah meningkat dibandingkan dengan Vina-rigid. Sayangnya, Vina mode fleksibel ini membutuhkan sumber daya yang tinggi untuk penambatan molekuler tergantung jumlah residu utama yang ditandai sebagai residu fleksibel.

Rantai alkena alifatik eugenol menjadi salah satu penentu interaksi ligan protein yang ditampilkan melalui SeeSAR (Gambar 10). Hal yang berbeda ditunjukkan oleh PSICHIC, rantai alifatik ini tidak ditandai sebagai atom yang terlibat dalam interaksi dan menentukan probabilitas sebagai antagonis protein MotA (Gambar 12). Gugus hidroksil, metoksi, dan alkil diduga menjadi penentunya sehingga kedelapan senyawa yang mirip eugenol ini diprediksi memiliki sifat antagonis yang besar.



Gambar 12. Atom penting yang terlibat dalam interaksi ligan protein diperoleh dari PSICHIC untuk eugenol dan 8 senyawa mirip dengan skor prediksi sebagai antagonis lebih dari 90%. Angka di bawah struktur kimia adalah CID senyawa dalam basis data PubChem.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa eugenol mampu menghambat motilitas *swimming* dan *swarming* pada *S. Typhi*. Eugenol kemungkinan berinteraksi dengan protein MotA yang merupakan komponen pada motor flagela *S. Typhi*.

DAFTAR PUSTAKA

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Chaban, B., Hughes, H.V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 46, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>
- Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, 637, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449>
- Chelvam, K.K., Chai, L. C., & Thong, K. L. (2014). Variations in motility and biofilm formation of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Gut Pathogens*, 6(2), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-2>
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as

- an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>
- Guo, J., He, X., Bai, Y., Sun, H., & Yang, J. (2025). Virulence factors of *Salmonella Typhi*: interplay between the bacteria and host macrophages *Archives of Microbiology*, 207. <https://doi.org/10.1007/s00203-025-04297-0>
- Hoffman, S. A., & Luby, S. P. (2024). *Salmonella Typhi* and *Salmonella Paratyphi*. In G. W. Smithers (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety, Second Edition, Volume 1-4* (Second, Vols. 1–4, pp. 276–284). Academic Journals. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00031-9>
- Irazoki, O., Campoy, S., & Barbé, J. (2017). The transient multidrug resistance phenotype of *Salmonella enterica* swarming cells is abolished by sub-inhibitory concentrations of antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8(1360), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01360>
- Li, J., Jia, T., & Yang, L. (2025). Targeting anti-virulence factor strategies of bacterial pathogens. *Biosafety and Health*, 7(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2025.01.006>
- Liu, G., Zhang, X., Cao, Q., Chen, T., Hu, B., & Shi, H. (2025). The global burden of typhoid and paratyphoid fever from 1990 to 2021 and the impact on prevention and control. *BMC Infectious Diseases*, 25(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11223-8>
- Nisar, M. F., Khadim, M., Rafiq, M., Chen, J., Yang, Y., & Wan, C. C. (2021). Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/2497354>
- Qaiyumi, S. (2007). Macro and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing. In *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols* (pp. 75–79).
- Rattanachak, N., Weawsiangsang, S., Daowtak, K., Thongsri, Y., Ross, S., Ross, G., Nilsri, N., Baldock, R.A., Pongcharoen, S., Jongjitvimol, T., & Jongjitwimol, J. (2022). High-throughput transcriptomic profiling reveals the inhibitory effect of hydroquinine on virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 11(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101436>
- Rütschlin, S., & Böttcher, T. (2020). Inhibitors of bacterial swarming behavior. *Chemistry - A European Journal*, 26(5), 964–979. <https://doi.org/10.1002/chem.201901961>
- Sultan, M., Arya, R., & Kim, K.K. (2021). Roles of two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms222212152>
- Sun, Y., Wang, P., Chai, Y., Song, R., Cheng, M., Gao, J., Duma, L., Rossez, Y., Zou, X., Tao, Y., & Yang, H. (2026). Targeting bacterial motility: prospective therapeutic countermeasures. *Microbiological Research*, 303, 128369. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2025.128369>
- Wiles, T.J., Schlomann, B.H., Wall, E.S., Betancourt, R., Parthasarathy, R., & Guillemin, K. (2020). Swimming motility of a gut bacterial symbiont promotes resistance to intestinal expulsion and enhances inflammation. *PLoS Biology*, 18(3), 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000661>