



# Produksi Biofilm oleh Strain *Klebsiella pneumoniae* Resistan Antibiotik

Indah Sulistiyawati<sup>1\*</sup>, Daniel Joko Wahyono<sup>2</sup>, dan Wahyu Siswandari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Nahdlatul Ulama Purwokerto. Jl. Sultan Agung No.42 Winduraso Karanglesem Kecamatan Purwokerto Selatan Kabupaten Banyumas Jawa Tengah 53145 Indonesia. indah.sulistiyawati.s2@gmail.com

<sup>2</sup>Departemen Biologi Molekuler Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. danieljokowahyono13@gmail.com

<sup>3</sup>Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. wahyu\_swdr@yahoo.com

Diterima: 08-11-2024

Disetujui: 14-11-2024

Dipublikasi: 15-11-2024

© 2024 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo Kendari

## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is known as a Gram-negative bacterium that most often causes infections and is resistant to antibiotics, making it very difficult to treat. Bacteria have several resistance mechanisms, one of which is biofilm production. The purpose of this study was to analyze the biofilm production of *Klebsiella pneumoniae* strains that are resistant to the antibiotic ciprofloxacin, as a form of defense mechanism. The *in vitro* research method was used to achieve the goal, carried out by testing clinical specimens of blood, sputum, pus, urine, feces, pleural fluid, with the process of isolation and identification, resistance testing and measuring biofilm production. The tested resistant *K. pneumoniae* isolates have a resistance mechanism by producing strong, medium and weak qualification biofilms, as well as low porin cell permeability. A strong significant correlation was formed in biofilm production with the amount of bacterial cell growth at the MIC value, which can increase cases of resistance prevalence.

**Keywords:** *biofilm, Klebsiella pneumoniae, resistance, antibiotics*

## Abstrak

*Klebsiella pneumoniae* dikenal sebagai bakteri Gram negatif yang paling sering menjadi penyebab infeksi dan resistan terhadap antibiotik sehingga sangat sulit diobati. Bakteri memiliki beberapa mekanisme resistansi salah satunya produksi biofilm. Tujuan penelitian ini menganalisis produksi biofilm strain *Klebsiella pneumoniae* yang resistan antibiotik ciprofloxacin, sebagai bentuk mekanisme pertahanan. Metode penelitian *in vitro* pengujian spesimen klinis spesimen darah, sputum, pus, urine, feses, cairan pleura, dengan proses isolasi dan identifikasi, pengujian resistansi serta pengukuran produksi biofilm menggunakan spektrofotometri. Isolat *K. pneumoniae* yang resistan teruji memiliki mekanisme resistansi dengan memproduksi biofilm kualifikasi kuat, sedang dan lemah, serta rendahnya kemampuan permeabilitas sel porin. Korelasi signifikan kuat terbentuk pada produksi biofilm dengan jumlah pertumbuhan sel bakteri pada nilai MIC, yang dapat meningkatkan kasus prevalensi resistansi.

**Kata kunci:** *biofilm, Klebsiella pneumoniae, resistan, antibiotik*

## PENDAHULUAN

*Klebsiella pneumoniae* merupakan patogen utama pada manusia yang menyebabkan kasus infeksi selama beberapa dekade terakhir (Alvi *et al.*, 2021; Malekshahi *et al.*, 2021; Moradigaravand *et al.*, 2017) diantaranya: infeksi saluran kemih, bakteremia, dan abses hati (Paczosa, 2016). Di rumah sakit keberadaan *K. pneumoniae* menjadi perhatian utama. Bakteri *K. pneumoniae* pada kasus infeksi aliran darah di rumah sakit menyebabkan kematian 12-80%, strain tersebut mendominasi pada isolat bakteri Gram negatif (Patel Singh *et al.*, 2021), dengan penemuan sejumlah 15,10% (Banerjee *et al.*, 2018; Cataldo *et al.*, 2020; Custovic *et al.*, 2014).

Penggunaan antibiotik yang tidak tepat serta dosis obat yang berlebihan menjadi pemicu masalah MDR (Burke *et al.*, 2012; Nahar *et al.*, 2020). Perawatan akan menjadi sulit dengan meningkatnya resistansi antibiotik, serta adanya variasi geografis isolat yang resistansi menjadi acuan pemilihan antibiotik untuk spesies isolat bakteri tertentu (Mehrad *et al.*, 2015; Zlatian *et al.*, 2018). Kelompok kuinolon dari ciprofloxacin di tahun 2018 dikategorikan oleh organisasi kesehatan dunia atau *World Health Organization* (WHO) sebagai salah satu antibiotik dengan kriteria kelas penting yang diberikan lini pertama terapi pada manusia (WHO, 2019). Ciprofloxacin merupakan salah satu pilihan terapi untuk infeksi yang disebabkan oleh bakteri dari famili Enterobacteriaceae (Handal *et al.*, 2017). Terapi pengobatan kasus dengan infeksi patogen *K. pneumoniae* menggunakan fluoroquinolon sebagai kelas antibiotik utama dengan agennya ciprofloxacin. Berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/342/2017 tentang pedoman nasional pelayanan kedokteran tata laksana sepsis menyebutkan bahwa pemberian antibiotik dari kelas kuinolon untuk fluoroquinolon dengan kategori ciprofloxacin berspektrum luas (Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, Nomor HK.01.07/MENKES/342/2017 Tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran

Tata Laksana Sepsis, 2017). Bakteri dapat menunjukkan resistansi antibiotik dengan beberapa sifat yang diperoleh yaitu intrinsik, didapat dan adaptif (Lee, 2019). Mekanisme resistansi bakteri yang dapat dilakukan terhadap antibiotik antara lain adanya penghancuran atau modifikasi antibiotik dengan kemampuannya dalam bertahan pada kondisi lingkungan dengan membentuk biofilm; perubahan target dapat terjadi dengan: penggantian, mutasi situs, perubahan enzimatis situs, perlindungan situs, produksi berlebih; dan pengurangan akumulasi antibiotik karena penurunan permeabilitas (aktivitas porin) dan peningkatan *efflux pump* (Aldred *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Bassetti *et al.*, 2018). Kemampuan bakteri membentuk biofilm dapat dijadikan indikator resistansi antibiotik, faktanya resistansi biofilm terhadap antibiotik meningkat dibandingkan dengan yang terlihat pada sel planktonik (Paluch *et al.*, 2020). Sel dalam keadaan biofilm akan menjadi 10-1000 kali lebih tahan terhadap efek antimikroba (T. F. C. Mah & O'Toole, 2001).

Mikroorganisme memiliki kemampuan untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang terkadang keras, salah satunya dengan strategi membentuk biofilm. Biofilm umumnya didefinisikan sebagai *sessile* konsorsium mikroba yang terbentuk dengan tiga dimensi struktur. Biofilm terdiri dari komunitas multiseluler sel prokariotik dan atau eukariotik yang tertanam dalam matriks serta bahan yang disintesis oleh komunitas mikroba (Azeredo *et al.*, 2017). Biofilm dapat terdiri dari spesies bakteri tunggal atau ganda (T. F. C. Mah & O'Toole, 2001; Sahoo *et al.*, 2021).

Pembentukan biofilm dapat terjadi dalam proses multi tahap yang dimulai dengan adhesi mikroba dan akumulasi matriks ekstraseluler (Miquel *et al.*, 2016) tersusun oleh satu atau lebih zat polimer seperti protein, polisakarida, zat humat, DNA ekstraseluler dan molekul lain, yang saling terlibat dalam komunikasi sel (*quorum sensing*) (Azeredo *et al.*, 2017). Dapat dijelaskan lebih rinci bahwa bakteri mengalami proses pembentukan biofilm yang dikategorikan dalam tahapan-tahapan seperti adhesi awal, adhesi *irreversible*, pembentukan struktur spasial, maturasi dan

dispersi akhir. Adhesi bakteri ke permukaan serta kohesi (interaksi sel-sel) dapat terjadi karena adanya beberapa pelengkap bakteri seperti flagela atau pili atau melalui faktor fisik seperti adanya gaya van der Waal atau interaksi elektrostatis (Jamal et al., 2018; Paluch et al., 2020). Biofilm bakteri terbentuk ketika organisme uniseluler berkumpul untuk membentuk komunitas yang melekat pada permukaan padat dan terbungkus dalam matriks eksopolisakarida yang mampu meningkatkan perlindungan sel mikroba terhadap faktor bahaya.

Kemampuan bakteri membentuk biofilm dapat dijadikan suatu indikator resistansi antibiotik, faktanya resistansi biofilm terhadap antibiotik meningkat dibandingkan dengan yang terlihat pada sel planktonik (Paluch et al., 2020). Sel dalam keadaan biofilm akan menjadi 10-1000 kali lebih tahan terhadap efek antimikroba (T. F. C. Mah & O'Toole, 2001). Bakteri *K. pneumoniae* Gram negatif yang dikenal memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Penelitian yang telah dilakukan tahun 2018 berkenaan dengan *K. pneumoniae*, penyebaran biofilm pada strain penghasil ESBL telah menunjukkan 98,8% *K. pneumoniae* mampu menghasilkan biofilm dalam jumlah besar, dengan adanya fimbriae tipe tiga yang diketahui berfungsi sebagai pelengkap dan memediasi pembentukan biofilm, serta penentu utama spesifitas dalam pengikatan fimbrial (Surgers et al., 2019).

Sejumlah 64,7% isolat *K. pneumoniae* yang diisolasi dari RS Klaten Indonesia mampu memproduksi biofilm dengan kategori tinggi atau sedang, dan 35,3% diidentifikasi produsen biofilm lemah (Nirwati et al., 2019). Isolat *K. pneumoniae* yang diisolasi dari sampel darah, dahak, dan urine, ditemukan mampu menghasilkan biofilm 37,6%, dan termasuk dalam kasus MDR dengan prosentase temuan kasus 38% resistan terhadap tiga atau lebih keluarga antibiotik, dan tertinggi kasus resistan terhadap ciprofloxacin (Cepas et al., 2019). Biofilm yang terbentuk berkorelasi dengan resistansi terhadap spesifik antibiotik, sejumlah isolat penghasil biofilm menunjukkan pola yang lebih terhadap resistansi dibandingkan non-biofilm.

Kondisi lingkungan mikro dalam biofilm seperti; gradien konsentrasi oksigen, metabolit dan sinyal molekul dapat menyebabkan perubahan dalam profil ekspresi gen yang selanjutnya dapat mengubah lingkungan mikro dari setiap sel tertentu dalam biofilm (T. Mah, 2012). Beberapa penelitian menyelidiki kasus ekspresi gen diferensial dalam biofilm menggunakan mikroskop fluoresen, misalnya lokus gen *agr* mengkodekan sistem penginderaan kuorum *S. aureus* (Kong et al., 2006). Strain *P. aeruginosa*, memiliki *rhamnolipids* sebagai surfaktan dalam pengembangan biofilm sangat penting. Ekspresi gen sintesis *rhamnolipid*, gen *rhlAB*, berada dibawah kendali penginderaan kuorum (Lequette & Greenberg, 2005). Penelitian Yang et al. (2007), menunjukkan ekspresi gen *pqqA* yang awalnya menyebar ke seluruh biofilm dalam umur biofilm 1 hari tetapi kemudian terlokalisasi ke lapisan luar makrokoloni biofilm pada hari ke-2, dan pada hari ke-4 ekspresi hampir tidak ada (Yang et al., 2007). Ekspresi gen dalam biofilm bervariasi dari waktu ke waktu dan ruang.

Matriks biofilm terdiri dari polisakarida ekstraseluler, DNA dan protein yang berfungsi untuk memberikan struktur dan perlindungan pada sel-sel dalam biofilm. Antibiotik fluoroquinolones ciprofloxacin mampu menembus biofilm *P. aeruginosa*, sedangkan antibiotik aminoglikosida tidak mampu menembus biofilm (Walters III et al., 2003). Sebaliknya penelitian lain menunjukkan bahwa ciprofloxacin dikonsumsi oleh komponen matriks dan karena itu tidak menyebar melalui matriks dengan sangat cepat (T. Mah, 2012). Penelitian yang telah dilakukan Tang et al, (2020) melaporkan bahwa *K. pneumoniae* memiliki tingkat positif biofilm sebesar 96,72%, yang menunjukkan sebagian besar infeksi yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* klinis terkait dengan pembentukan biofilm

Dinamika pembentukan biofilm dan variabilitas rangsangan lingkungan, maka bakteri harus memiliki kemampuan untuk secara cepat dan ekstensif mengubah ekspresi gen. Regulasi transkripsi diatur oleh penginderaan kuorum, suatu sistem yang mengkoordinasikan sinyal dan respon

yang mengontrol ekspresi gen dalam populasi mikroba. Regulator dan *autoinducer* terkait kuorum yang diduga *K. pneumoniae* telah diidentifikasi tetapi daya relevan yang tersedia belum lengkap. Strain *K. pneumoniae* dengan biofilm sebagian dilindungi dari respon imun penjamu. Matrik ini menghambat kedekatan antibodi dan peptida antimikroba serta mengurangi efek komplemen dan fagositosis (Wang et al., 2020). Mutasi pada beberapa gen spesifik *K. pneumoniae* juga dapat mempengaruhi fungsi biofilm. Mostafavi et al, (2018) menemukan bahwa mutasi gen *fabZ* dan gen *lpxC* menyebabkan pertumbuhan *K. pneumoniae* yang bergantung pada inhibitor *lpxC* dapat menyebabkan hilangnya homeostasis biofilm (Mostafavi et al., 2018). Penelitian Hsieh et al, (2016) melaporkan bahwa protein membran luar *Yfgl* (BamB) lipoprotein terlibat dalam pembentukan biofilm *K. pneumoniae* dan adanya ekspresi transkripsi pili tipe satu yang sangat penting untuk anti-fagositosis *K. pneumoniae* secara *in vivo* (Hsieh et al., 2016). Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis produksi biofilm yang dilakukan oleh strain *Klebsiella pneumoniae* yang resistan antibiotik ciprofloxacin, sebagai bentuk mekanisme pertahanan.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di tahun 2024, yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Rumah Sakit Umum Daerah Prof. Dr. Margono Soekarjo Purwokerto, dengan nomor surat Persetujuan Etik Penelitian : 420/08640.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin Vitek ® 2 Compact, alat BACTEC 9050, 96-well *microtiter plate*, autoreader mikro ELISA

(model 680, Bio Rad, UK), mikropipet 200 µL, mikropipet 10 µL, LC-MS/MS spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm, foto elektron FE-SEM (Mikroskopi Elektron Pemindaian Emisi Lapangan), CFU (*colony forming units*), densitometer atau spektrofotometer, perangkat lunak IBM SPSS Statistic 26, Mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi; spesimen darah, sputum, pus, urine, feses, cairan pleura, medium penyubur BD Bactec, pewarnaan Gram Stain, media MacConkey dan Blood Agar, NaCl 0,45%, medium Blood Agar, media MacConkey, reagen bakteri Gram negatif VITEK® 2 AST-GN93, *crystal violet*, TSB (*Trypticase soy broth*), PBS (*Phosphate-buffered saline*), *acid isopropanol* 5% (HCl dan 2 propanol), antibiotik ciprofloxacin.

### Pembentukan Biofilm

Pengukuran biofilm yang diproduksi oleh *K. pneumoniae* dilakukan secara kuantitatif dengan menumbuhkan pada permukaan 96-well *microtiter plate*, tes tersebut dianggap sebagai metode baku untuk deteksi biofilm (Hassan et al., 2011b). Permukaan yang terwarnai *crystal violet* dilarutkan untuk pemeriksaan semikuantitatif pembentukan biofilm dengan menghitung densitas optik (OD)/absorbansi pada panjang gelombang 630 nm. Isolat bakteri dari *plate* agar segar diinokulasi (dengan ose steril) pada 3 mL medium TSB (*Trypticase soy broth*) dalam tabung berukuran 50 mL, kemudian di *shaking* pada 37°C selama 6 jam. Kultur kemudian diencerkan 1:100 (10 µL kultur dalam 1 mL TSB) pada tabung 1,5 mL. Pada masing-masing sumuran 96-well *microtiter plate*, dimasukkan dengan pipet sebanyak 100 µL TSB dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Kultur *K. pneumoniae* yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran sejumlah 10 µL. *Plate* ditutup dengan plastik (*wrapping*) dan inkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Gelas beker kecil (100 mL) berisi desinfektan disiapkan untuk tempat pembuangan.

Bakteri planktonik secara hati-hati dari masing-masing sumuran dibuang dengan mikropipet berukuran 200 µL, dan

larutan yang diambil sebanyak 130  $\mu$ L. Larutan diambil perlahan dengan mikropipet dan biofilm ditinggalkan di dasar sumuran hingga dasar sumuran terlihat jernih. Bakteri *non-adherent* dibuang dengan mencuci menggunakan 300  $\mu$ L PBS (*Phosphate-buffered saline*). Pipet berukuran 1000  $\mu$ L digunakan untuk mengambil larutan PBS 900  $\mu$ L, kemudian larutan PBS diisikan ke dalam sumuran dengan strain yang sama. PBS dibuang dengan pipet berukuran 200  $\mu$ L (sebanyak 2 kali) secara perlahan-lahan. Masing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L larutan *crystal violet* 1% (diusahakan pipet tidak menyentuh dasarnya), dan disimpan 30 menit dalam suhu ruang (di atas meja). Selama menunggu proses tersebut, dilakukan *warm up biofilm reader autoreader micro* ELISA (model 680, Bio Rad, UK). Box berisi air kran disiapkan untuk mencuci 96-well microtiter plate. Kristal violet dibuang dengan menggunakan pipet 200  $\mu$ L yang diatur dalam angka 130  $\mu$ L. Sumuran dicuci dengan menenggelamkan plate ke dalam box dan dibuang dengan membalik secara keras hingga air keluar dari sumuran. Air dalam box diganti jika terlihat gelap. Pengeringan dituntaskan dengan membalik plate pada kertas handuk/tissue. Setelah langkah ini plate di foto terlebih dahulu untuk

memperkirakan hasil. Plate yang telah kering dengan pewarnaan stabil, dapat disimpan pada suhu ruang selama beberapa minggu. Selanjutnya pada sumuran yang telah diwarnai ditambah *acid isopropanol* 5% (HCl dan 2 propanol). Satu baris sumuran paling atas/bawah diisikan dengan etanol 70% sebanyak 100  $\mu$ L sebagai kontrol (*blank*). Plate ditutup agar pewarnaan larut dan diinkubasi 10-15 menit pada suhu ruang. Masing-masing isi sumuran dicampur dengan pipet. OD dihitung pada panjang gelombang 630 nm.

Pengamatan dan interpretasi produksi biofilm dilakukan sesuai dengan kriteria (Tabel 1) (Hassan et al., 2011). Densitas optikal (OD) biofilm diukur dari pengurangan intensitas cahaya (absorbansi) tingkat molekuler dan atau refleksi dari komponen yang lebih besar seperti sel-sel. Absorbansi cahaya oleh biofilm berkorelasi dengan massa sel biofilm dan massa biofilm total (Bakke et al., 2001). Interpretasi nilai OD bakteri penghasil biofilm dilakukan berdasar nilai OD rata-rata yang ditunjukkan pada Tabel 1. Sampel yang menghasilkan biofilm fenotipe diperiksa menggunakan foto elektron FE-SEM (Mikroskopi Elektron Pemindaian Emisi Lapangan) (Khodadadian et al., 2018).

**Tabel 1.** Interpretasi nilai OD produksi biofilm (Hassan et al., 2011)

Produksi biofilm	Nilai Rata-rata OD
Tidak menghasilkan (biofilm lemah)	ODc/ODc < ~ $\leq$ 2 X ODc
Sedang	2 X ODc < ~ $\leq$ 4 X ODc
Kuat	> 4 X ODc

Keterangan: *Optical density cutoff* value (ODc) = rata-rata OD kontrol negatif + 3 X SD kontrol negatif. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 630 nm.

### Analisis Data

Data hasil penelitian di analisis menggunakan Analisis korelasi mekanisme resistansi diuji dengan korelasi pearson dan analisis regresi korelasi logaritmik dengan perangkat lunak IBM SPSS Statistik 26. Hasil disajikan sebagai rasio prevalensi dengan interval kepercayaan 95%, signifikansi statistik ditetapkan jika p-value <0,05.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian kemampuan menghasilkan biofilm pada isolat *K. pneumoniae* resistan ciprofloxacin dilakukan untuk mengetahui mekanisme perlawanan terhadap antibiotik. Isolasi sampel spesimen pasien memperoleh 58 isolat dengan karakteristik *K. pneumoniae*. Hasil pengujian 58 isolat tersebut mampu menghasilkan biofilm. Data yang diperoleh dihasilkan sejumlah 24 (41,4%) isolat penghasil biofilm kuat, sejumlah 22 (37,9%) isolat penghasil biofilm sedang, dan sisanya 12 (20,7%) isolat kategori penghasil biofilm lemah (Tabel 2).

Kemampuan penghasil biofilm dilihat dari besaran nilai *optical density* (OD), nilai OD rata-rata yang diperoleh berdasarkan nilai *cut-off* OD<sub>c</sub> = 0,089459. Berdasarkan data tersebut maka dapat dikelompokkan sebesar 41,4% (24/58) isolat termasuk kelompok penghasil biofilm kuat dengan nilai rata-rata OD = 0,9401.

Kelompok penghasil biofilm sedang sebesar 37,9% (22/58) dengan nilai rata-rata OD = 0,2428 dan kelompok penghasil biofilm lemah sebesar 20,7% (12/58) yang menghasilkan nilai rata-rata OD = 0,1176. Nilai tersebut jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan isolat kontrol (isolat sensitif) yang tidak menghasilkan biofilm. Sejumlah 24 isolat *K. pneumoniae* penghasil biofilm yang kuat didistribusikan secara merata antar pasien yang terinfeksi dengan perawatan di ruang intensif (ICU, ICCU, PICU, HCU) serta rawat inap, dengan spesimen uji yang diisolasi mayoritas berasal dari sputum, selain itu ditemukan pula pada spesimen urine, darah dan pus. Pasien terinfeksi isolat *K. pneumoniae* penghasil biofilm kuat ditemukan pada usia mayoritas lebih dari

atau >40 tahun, meskipun ada satu kasus pada bayi usia satu bulan 25 hari.

Penelitian ini sesuai dengan yang telah dilaporkan Cepas *et al.* (2019) bahwa 37,6% strain *K. pneumoniae* merupakan produsen biofilm. Strain *K. pneumoniae* MDR ditemukan 38% kasus resistan terhadap tiga kelompok antibiotik, dan tertinggi pada ciprofloxacin. Studi Nirwati *et al.* (2019) menemukan 143 (86,63%) *K. pneumoniae* penghasil biofilm, dengan kategori 26,95% kuat, 28,74% sedang dan 29,95% lemah. Melzer *et al.* (2008) telah mengisolasi isolat *K. pneumoniae* dari berbagai sumber dahak, urine, dan sampel lainnya yang mampu memproduksi biofilm, pada isolat dari sampel sputum terdapat perbedaan laju pembentukan biofilm secara statistik antara kelompok yang lebih tua usia >70 tahun dan lebih muda <70 tahun dengan nilai  $p < 0,01$  yang menunjukkan biofilm lebih sering terbentuk pada pasien yang lebih tua. Surgers *et al.*, (2019) juga menyatakan bahwa *K. pneumoniae* penghasil ESBL hampir 98,8% menghasilkan biofilm, dan memiliki gen *mrkD* protein di ujung fimbriae tipe 3 yang menghasilkan biofilm.

**Tabel 2.** Kapasitas produksi biofilm isolat klinis *K. pneumoniae* resistan ciprofloxacin

Karakteristik	Jumlah (%)
Penghasil biofilm lemah	12 (20,69)
Penghasil biofilm moderat/sedang	22 (37,93)
Penghasil biofilm kuat	24 (41,38)
Total	58 (100)

Biofilm dari isolat *K. pneumoniae* yang resistan ciprofloxacin ditumbuhkan dalam 96-well *microtiter plate* berisi medium cair TSB selama 24 jam. Biofilm yang tumbuh merupakan campuran koloni bakteri disatukan oleh matrik polisakarida, dan zat polimer ekstraseluler berbentuk selaput lendir atau slime, mengandung materi genetik DNA bakteri dan protein.

Penelitian ini melakukan pengujian permeabilitas menggunakan indikator mekanisme resistansi dengan *minimum inhibitory concentration* /konsentrasi hambat minimum (MIC mg/L) dengan metode mikrodilusi untuk memprediksi tingkat resistansi. Hasil Tabel 3 menunjukkan resistansi *K. pneumoniae* pada ciprofloxacin memiliki variasi nilai MIC

mulai dari 1, 2 dan 4 mg/L. Isolat uji sejumlah 58 memiliki nilai mayoritas MIC yaitu 4 mg/L terdapat 34 isolat dengan nilai MIC 4 mg/L, 6 isolat nilai MIC 2 mg/L, dan 18 isolat nilai MIC 1 mg/L. Nilai absorbansi atau serapan suspensi bakteri kontrol dibandingkan dengan suspensi bakteri perlakuan diperoleh data penurunan nilai serapan. Perlakuan dengan dosis MIC  $\geq 4$  mg/L menunjukkan penurunan serapan OD berkisar 0,005-0,912 dan penurunan jumlah sel/bakteri yaitu  $1-79 \times 10^6$  CFU/mL, dari nilai awal jumlah sel bakteri rata-rata  $10,15 \times 10^7$  CFU/mL.

Penurunan absorbansi dan berkurangnya jumlah sel bakteri pada perlakuan MIC 4 mg/L mengindikasikan adanya penghambatan

pertumbuhan sel bakteri oleh ciprofloxacin, sehingga tidak dapat berjalannya mekanisme resistansi terhadap ciprofloxacin pada konsentrasi tersebut. Konsentrasi MIC  $\geq 4$  mg/L isolat *K. pneumoniae* yang resistan memiliki batasan minimum untuk dapat dihambat, tidak berfungsinya permeabilitas dinding sel bakteri dalam membatasi masuknya antibiotik dengan konsentrasi tersebut mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Nilai MIC yang dihasilkan pada penelitian ini termasuk dalam kategori yang tinggi pada isolat resistan, sesuai standar

*Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) resistan terhadap ciprofloxacin nilai MIC  $\geq 4$  mg/L (Patel *et al.*, 2015), akan tetapi hal ini berbeda dengan MIC pada kasus isolat rentan yang dengan nilai MIC 0,016 mg/L, 0,047 mg/L, 0,38 mg/L dan 0,75 mg/L (Grillon *et al.*, 2016). Kondisi masing-masing yang berbeda meskipun memiliki kemampuan resistansi tetapi lemah menghasilkan biofilm ini mengkorelasikan bahwa tingkatan resistansi terkait dengan pembentukan biofilm.

**Tabel 3.** Nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) ciprofloxacin dengan parameter variabel resistansi

		MIC (mg/L)		
		1	2	$\geq 4$
Laki-laki		10	3	22
Perempuan		8	3	12
Jumlah sampel		18	6	34
Absorbansi mikrodilusi (OD)	minimal	0,55	0,065	0,033
	maksimal	1,253	0,927	1,005
	mean (rata-rata)	0,584	0,4895	0,284
Jumlah sel bakteri (CFU/mL)	minimal	3	1	1
	maksimal	75	72	79
	mean (rata-rata)	32	19	34
Persentase penghambatan (%)	minimal	3,509	7,232	2,956
	maksimal	91,311	90,566	93,924
	mean (rata-rata)	31,506	34,719	47,22
Produksi biofilm	Kuat	6	1	17
	Sedang	10	2	10
	Lemah	2	3	7

Distribusi produksi biofilm pada isolat resistan *K. pneumoniae* dikaitkan dengan pertumbuhan jumlah sel bakteri, berdasarkan data penelitian pada Tabel 4 menunjukkan bahwa pada produksi biofilm

lemah jumlah sel bakteri rata-rata  $4 \times 10^6$  CFU/mL, yang jumlahnya jauh lebih kecil dibandingkan pada produksi biofilm kuat dengan nilai rata-rata jumlah sel bakteri  $44 \times 10^6$  CFU/mL.

**Tabel 4.** Distribusi produksi biofilm dan pertumbuhan jumlah sel bakteri *K. pneumoniae*, dengan analisis regresi korelasi *Pearson*

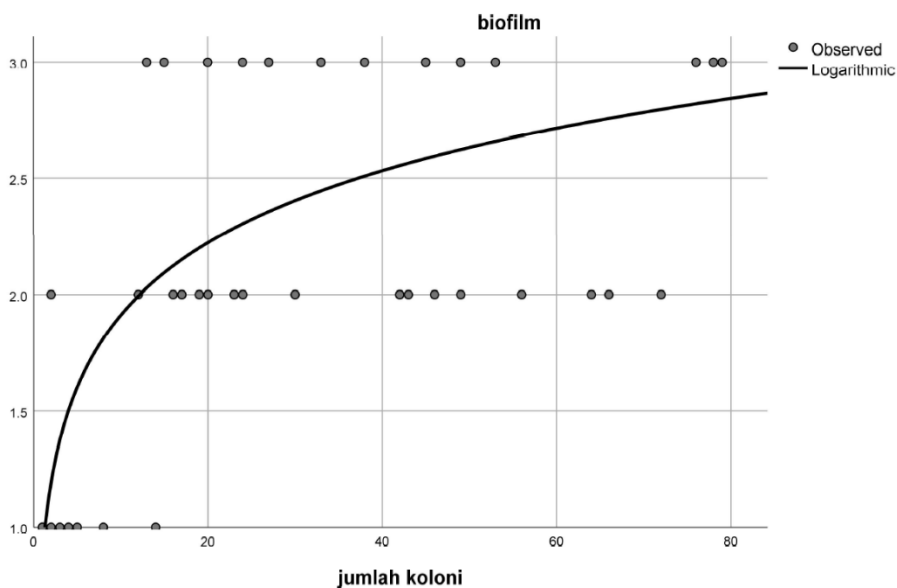
Produksi Biofilm	Jumlah sel bakteri $10^6$ CFU/mL	r korelasi	(regresi p-value)
Lemah		0.628**	0.000

	minimal	1
	maksimal	14
	mean (rata-rata)	4
<hr/>		
Sedang	minimal	2
	maksimal	72
	mean (rata-rata)	34
<hr/>		
Kuat	minimal	13
	maksimal	79
	mean (rata-rata)	44

Keterangan : \*\*Signifikansi statistik, p-value<0.005

Berdasarkan hasil analisis statistik korelasi pearson Tabel 4 antara produksi biofilm dengan jumlah sel bakteri yang terbentuk dari hasil penghambatan nilai MIC, terdapat hubungan positif yang signifikan. Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai signifikansi korelasi ( $p < 0.05$ ) yaitu 0.000 maka memiliki korelasi. Nilai derajat hubungan pearson correlation 0.628 (Tabel 4) dapat diartikan dengan korelasi yang kuat. Uji analisis statistik dilanjutkan pada uji regresi korelasi regresi yang

diperoleh data ANOVA signifikansi ( $p < 0.05$ ) dengan variabel independen jumlah sel bakteri terhadap pembentukan biofilm. Hubungan korelasi yang terbentuk merupakan hubungan positif, dimana produksi biofilm yang kuat mengindikasikan tingginya jumlah sel bakteri *K. pneumoniae*, digambarkan pada grafik logaritmik (Gambar 1). Penelitian ini mengindikasikan produksi biofilm berkorelasi kuat dengan pertumbuhan sel bakteri.



**Gambar 1.** Grafik Logaritmik regresi korelasi pembentukan biofilm dengan pertumbuhan jumlah sel bakteri pada media dengan penghambatan MIC 1, 2 dan 4 mg/L.

Produksi biofilm yang ditunjukkan pada Tabel 3, merupakan tahap penting dalam virulensi dan resistansi pada isolat uji strain *K. pneumoniae*. Proses tahapan awal pembentukan biofilm dicirikan sebagai perlekatan awal yang merupakan tahap penting dalam proses, dilanjutkan pembentukan mikrokoloni, perkembangan

biofilm yang matang, dan pelepasan bakteri planktonik dari biofilm. Pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae* telah dihipotesiskan berkontribusi terhadap resistansi bakteri yaitu berkurangnya kerentanan terhadap antibiotik (Murphy & Clegg, 2012). Bakteri pembentuk biofilm yang resistan antibiotik akan semakin



menunjukkan resistansinya terhadap antibiotik tersebut. Mekanisme resistansi ditunjukkan dengan adanya matriks biofilm yang mencegah difusi antibiotik sehingga menyebabkan paparan bakteri dalam biofilm menurun secara signifikan.

Beberapa antibiotik akan mudah berdifusi melalui matriks biofilm *K. pneumoniae* akan tetapi dengan cepat mudah dipecah. Pertumbuhan bakteri dalam biofilm yang cenderung lambat bila dibandingkan dengan bakteri planktonik menjadi sarana peningkatan resistansi antibiotik. Resistansi intrinsik terjadi karena adanya perubahan ekspresi gen bakteri yang tumbuh dalam biofilm, yang memungkinkan terjadinya transfer materi genetik antara sel bakteri dalam biofilm. Bakteri pembentuk biofilm telah dianggap memiliki dampak besar pada resistansi antibiotik, melalui pelepasan bakteri planktonik ke jaringan sekitarnya, biofilm menjadi sumber potensial infeksi dan menyebabkan infeksi persisten kronis atau infeksi berulang (Chen et al., 2016).

Kapasitas masing-masing isolat secara umum berbeda dalam menghasilkan biofilm, dipengaruhi oleh faktor karakteristik fisikokimia *K. pneumoniae*, yaitu interaksi fisik antara konstituen, jenis permukaan tempat biofilm menempel, suhu, pH dan faktor lainnya (Cherif-Antar et al., 2016). Strain yang mampu menghasilkan biofilm dianggap sebagai faktor kunci dalam resistansi ciprofloxacin. Adanya keterlibatan quorum sensing (QS) dalam pembentukan isolat resistansi dilihat dari terbentuknya perpaduan lipopolisakarida (Vuotto et al., 2017).

Penelitian ini menunjukkan *K. pneumoniae* resistan antibiotik merupakan produsen biofilm. Temuan ini telah dilaporkan pada banyak penelitian. Studi Saha et al. (2018) mendemonstrasikan isolat penghasil biofilm menampilkan pola yang lebih resistan dibandingkan bukan produsen biofilm. Pembentukan pertahanan berlapis pada biofilm menjadi salah satu faktor kesulitan dalam pemberantasan bakteri resistan, dengan terbentuknya lapisan biofilm sebagai lapisan pelindung biomaterial akan menyulitkan penetrasi antibiotik, (Agarwal & Jain, 2012), kemunculannya merupakan respon imun adaptif bakteri terhadap stres.

Biofilm pada *K. pneumoniae* telah terbukti dapat melawan sifat bakterisida antibiotik paparan jangka panjang pada ampicilin dan ciprofloxacin (Anderl et al., 2000). Resistansi strain *K. pneumoniae* pembentuk biofilm yang diisolasi dari perangkat medis terhadap agen antibiotik gentamicin, cefotaxime, dan ciprofloxacin telah dilaporkan (Samia et al., 2013). Faktor virulensi penting yang berperan dalam pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae* adalah polisakarida kapsuler, fimbriae tipe 1 dan tipe 3. Tipe 3 fimbria memulai pembentukan biofilm yang terdiri dari subunit protein *mrkA* (Chung, 2016). Studi ini melaporkan bahwa penemuan *K. pneumoniae* resistan ciprofloxacin pembentuk biofilm, akan berdampak pada pemberian kualitas dan kuantitas resep antibiotik di rumah sakit. Saha et al. (2018) menyatakan bahwa bakteri resistan pembentuk biofilm mengakibatkan perawatan antibiotik menjadi tidak efisien dan memunculkan infeksi kronis yang berakibat pada produksi biofilm bersifat persisten dan sangat sulit untuk diberantas.

## KESIMPULAN

Isolat *K. pneumoniae* yang resistan ciprofloxacin teruji mampu melakukan mekanisme resistansinya melalui produksi biofilm dengan kualifikasi kuat, sedang dan lemah. Korelasi signifikan kuat terbentuk pada produksi biofilm dengan pertumbuhan sel bakteri pada nilai MIC, yang dapat meningkatkan kasus prevalensi resistansi.

## UCAPAN TERIMA KASIH (Jika ada)

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi sebagai penyedia dana Penelitian melalui program Beasiswa Unggulan, serta Universitas Nahdlatul Ulama Purwokerto, RSUD Prof. Dr. Margono Soekardjo Purwokerto dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., & Jain, A. (2012). Association between drug resistance & production of biofilm in staphylococci Sir. April, 562–564.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Oshero, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry Including Biophysical Chemistry & Molecular Biology*, 53, 1565–1574.
- Alvi, R. F., Aslam, B., Rasool, M. H., Muzammil, S., Siddique, A. B., Yasmeen, N., Khurshid, M., Sarwar, N., Almatroudi, A., Hussain, R., & Baloch, Z. (2021). Transcriptional Response of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Ciprofloxacin Stress. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021, 3–8. <https://doi.org/10.1155/2021/55709> 63
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1818–1824. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Bakke, R., Kommedal, R., & Kalvenes, S. (2001). Quantification Of Biofilm Accumulation By An Optical Approach R. *Journal of Microbiological Methods*, 44(1), 13–26.
- Banerjee, T., Mishra, A., Das, A., Sharma, S., Barman, H., & Yadav, G. (2018). High Prevalence and Endemicity of Multidrug Resistant Acinetobacter spp. in Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital, Varanasi, India . *Journal of Pathogens*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/9129083>
- Bassetti, M., Righi, E., Carnelutti, A., Graziano, E., & Russo, A. (2018). Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16(10), 749–761. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1522249>
- Burke, L., Humphreys, H., & Fitzgerald-Hughes, D. (2012). The revolving door between hospital and community: Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dublin. *Journal of Hospital Infection*, 81(3), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.04.021>
- Cataldo, M. A., Tetaj, N., Selleri, M., Marchioni, L., Capone, A., Caraffa, E., Caro, A. Di, Petrosillo, N., & Co-infection, I.-. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January, 19–21.
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J. P., Bosch, J., & Soto, S. M. (2019). Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72–79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Chen, W., Li, B., Li, S., Ou, Y. wen, & Ou, Q. (2016). Effects of *Scutellaria Baicalensis* on Activity and Biofilm Formation of *Klebsiella Pneumoniae*. *Chinese Medical Sciences Journal*, 31(3), 180–184. [https://doi.org/10.1016/S1001-9294\(16\)30048-7](https://doi.org/10.1016/S1001-9294(16)30048-7)

- Cherif-Antar, A., Moussa–Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science and Technology*, 96(1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0235-4>
- Chung, P. Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(20), 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw219>
- Custovic, A., Smajlovic, J., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Tihic, N., & Hadzagic, H. (2014). Epidemiological Surveillance of Bacterial Nosocomial Infections in the Surgical Intensive Care Unit. *Materia Socio Medica*, 26(1), 7. <https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.7-11>
- Handal, R., Qunibi, L., Sahouri, I., Juhari, M., Dawodi, R., Marzouqa, H., & Hindiyeh, M. (2017). Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Palestine. *International Journal of Microbiology*, 2017(2006). <https://doi.org/10.1155/2017/8012104>
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305–311. [https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70197-0](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70197-0)
- Hsieh, P. F., Hsu, C. R., Chen, C. T., Lin, T. L., & Wang, J. T. (2016). The *Klebsiella pneumoniae* YfgL (BamB) lipoprotein contributes to outer membrane protein biogenesis, type-1 fimbriae expression, anti-phagocytosis, and in vivo virulence. *Virulence*, 7(5), 587–601. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1171435>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, Nomor HK.01.07/MENKES/342/2017 tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Sepsis, 1 (2017).
- Khodadadian, R., Rahdar, H. A., Javadi, A., Safari, M., & Khorshidi, A. (2018). Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 115(November 2017), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.036>
- Kong, K. F., Vuong, C., & Otto, M. (2006). Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2–3), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.042>
- Lee, J. H. (2019). Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *Journal of Microbiology*, 57(3), 181–184. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-0718-8>
- Lequette, Y., & Greenberg, E. P. (2005). Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 37–44. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.37-44.2005>
- Mah, T. (2012). *Biofilm-specific antibiotic resistance*. 1061–1072.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
- Malekshahi, S. S., Yavarian, J., Shafiei-

- Jandaghi, N. Z., Mokhtari-azad, T., & Farahmand, M. (2021). Prevalence of Human Metapneumovirus Infections in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal and Pediatric Pathology*, 40(6), 663–673. <https://doi.org/10.1080/15513815.2020.1725939>
- Mehrad, B., Clark, N. M., Zhanel, G. G., & Lynch, J. P. (2015). Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest*, 147(5), 1413–1421. <https://doi.org/10.1378/chest.14-2171>
- Melzer, M., Petersen, I., & Cheasty, T. (2008). The difference in serotypes between extended- $\beta$ -lactamase (ESBL) and non-ESBL-producing *E. coli* blood culture isolates at a UK district general hospital. *Journal of Hospital Infection*, 68(4), 367–369. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.01.006>
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., & Forestier, C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00592>
- Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). Evolution and epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.01976-16>
- Mostafavi, M., Wang, L., Xie, L., Takeoka, K. T., Richie, D. L., Casey, F., Ruzin, A., Sawyer, W. S., Rath, C. M., Wei, J.-R., & Dean, C. R. (2018). Interplay of *Klebsiella pneumoniae* fabZ and lpxC Mutations Leads to LpxC Inhibitor-Dependent Growth Resulting from Loss of Membrane Homeostasis. *MSphere*, 3(5), 1–15. <https://doi.org/10.1128/msphere.00508-18>
- Murphy, C. N., & Clegg, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiology*, 7(8), 991–1002.
- Nahar, P., Unicomb, L., Lucas, P. J., Uddin, M. R., Islam, M. A., Nizame, F. A., Khisa, N., Akter, S. M. S., & Rousham, E. K. (2020). What contributes to inappropriate antibiotic dispensing among qualified and unqualified healthcare providers in Bangladesh? A qualitative study. *BMC Health Services Research*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12913-020-05512-y>
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrnunissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., Hakim, M. S., Meliala, A., Aman, A. T., & Nuryastuti, T. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, 13(Suppl 11), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
- Paczosa, M. K. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>.Address
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Patel Singh, S., Yaduvanshi, N., Sahu, C., Singh, S., & Agarwal, A. (2021). Epidemiology, Antimicrobial susceptibility patterns and outcomes of bacteremia in an Apex trauma center of a tertiary health care institute with special reference to Methicillin Re... *International Journal of Medical Science and Current Research*, 4(2), 435–443.
- Saha, S., Devi, K. M., Damrolien, S., Devi, K. S., . K., & Sharma, K. T. (2018). Biofilm production and its correlation with antibiotic resistance pattern among clinical isolates of

- Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in north-east India. *International Journal of Advances in Medicine*, 5(4), 964. <https://doi.org/10.18203/2349-3933.ijam20183129>
- Sahoo, A., Swain, S. S., Behera, A., Sahoo, G., Mahapatra, P. K., & Panda, S. K. (2021). Antimicrobial Peptides Derived From Insects Offer a Novel Therapeutic Option to Combat Biofilm: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 12(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661195>
- Samia, B., Hafida, H., Damien, B., Nicolas, C., Imane, M. hamed, Ibtissem, K. T., Merieme, L., Wafae, D., & Christiane, F. (2013). Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49), 5558–5564. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.2331>
- Surgers, L., Boyd, A., Girard, P. M., Arlet, G., & Decré, D. (2019). Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.10.008>
- Tang, M., Wei, X., Wan, X., Ding, Z., Ding, Y., & Liu, J. (2020). The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104244. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104244>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Walters III, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317>
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- WHO. (2019). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* (6th revisi). World Health Organization.
- Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(5), 1318–1328. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004911-0>
- Zhou, X. Y., Ye, X. G., He, L. T., Zhang, S. R., Wang, R. L., Zhou, J., & He, Z. S. (2016). In vitro characterization and inhibition of the interaction between ciprofloxacin and berberine against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antibiotics*, 69(10), 741–746. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.15>
- Zlatian, O., Balasoiu, A. T., Balasoiu, M., Cristea, O., Docea, A. O., Mitrut, R., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Bancescu, G., & Calina, D. (2018). Antimicrobial resistance in bacterial pathogens among hospitalised patients with severe invasive infections. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(6), 4499–4510. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6737>