

# Deteksi *Acinetobacter baumannii* Multiresisten Obat Penghasil Biofilm menggunakan Pewarnaan Berbasis *Crystal Violet*

*Detection of Biofilm Formation on Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii Using Crystal Violet Based Staining Method*

Ardiana Kusumaningrum,<sup>\*1</sup> Iin Maemunah,<sup>2</sup> Dimas Seto Prasetyo<sup>1</sup>, Budiman Bela,<sup>1</sup> Fera Ibrahim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Medik Mikrobiologi Klinik FKUI – RSCM, <sup>2</sup>Rumah Sakit Tarakan, Jakarta

\*Korespondensi :

Ardiana Kusumaningrum

Email : ardiana.dr@gmail.com

## Abstrak

**Pendahuluan:** Kasus infeksi terkait biofilm merupakan masalah besar pada dunia kesehatan karena sifat kekebalannya terhadap antibiotik dan respon imun, terutama pada kasus infeksi kronik akibat *Acinetobacter baumannii*. Saat ini terdapat berbagai metode deteksi pembentukan biofilm, namun pemeriksaan tersebut belum dilakukan secara rutin karena berbagai keterbatasan. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi metode deteksi biofilm menggunakan bahan yang rutin tersedia di laboratorium serta mengukur proporsi sampel yang mengandung bakteri penghasil biofilm **Metode:** Desain penelitian ini adalah uji eksperimental. Pada penelitian ini dilakukan pengembangan deteksi pembentukan biofilm menggunakan metoda tabung *microcentrifuge tube* 1,5 ml berbahan *polypropylene* dengan zat warna berbasis *crystal violet* konsentrasi 0,1% dan 1%. Optimasi yang dilakukan meliputi media biakan, lama inkubasi, inokulum bakteri yang digunakan serta bahan pembilas. Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *A. baumannii* ATCC 19606 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif pemeriksaan yang dilakukan. **Hasil:** Pemeriksaan optimasi yang dilakukan, diperoleh kondisi optimal pembentukan biofilm menggunakan media Luria Bertani dengan besar inokulum 1 sengkelit penuh, lama inkubasi 30 jam dan pewarnaan dilakukan menggunakan *crystal violet* 0,1% serta bahan pembilas berupa PBS steril. Proporsi pembentukan biofilm pada *A. baumannii* multiresisten obat sebesar 55,3%. **Kesimpulan:** Metode deteksi pembentukan biofilm menggunakan metode tabung *polypropylene* yang dimodifikasi dan pewarnaan zat warna *crystal violet* 0,1% merupakan metode deteksi yang mudah dikerjakan, reproducible dan efisien, sehingga dapat dilakukan di laboratorium mikrobiologi klinik sederhana. Proporsi bakteri penghasil biofilm adalah lebih dari 50% *A. baumannii* resisten multiobat.

**Kata kunci :** infeksi terkait biofilm, deteksi biofilm, pewarnaan *crystal violet*, *Acinetobacter baumannii*

## Abstract

**Introduction:** Biofilm-associated infections have emerged as a major public health concern because of its highly resistant to both antibiotics and host immune defenses, especially in chronic infections due to *Acinetobacter baumannii*. There are various methods to detect biofilm production, but currently, this assay is not performed routinely due to various limitations. Therefore, it is necessary to optimized biofilm detection methods using the materials available in the laboratory. **Method:** The study design was an experimental study. The objective of this study was to develop an optimized staining method in detecting biofilm formation using *polypropylene tube* with 1% and 0,1% concentration of *crystal violet*. Optimization was conducted in the incubation period, bacterial inoculum and rinse material used. Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *A. baumannii* ATCC 19606 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as positive and negative control. **Result:** In general, the optimized biofilm formation were showed in Luria Bertani media with 1 McFarland inoculum of bacteria, 30 hours incubation period and staining using 1% *crystal violet* as well as PBS as rinsing material. **Conclusion:** Detection of biofilm formation using modified *polypropylene-tube* with *crystal violet* 1 % staining dye, could be performed in simple clinical microbiology laboratory because easy to do, reproducible and efficient. The proportion of biofilm-producing showed that more than 50% of multirug resistant *A. baumannii*.

**Keywords :** biofilm-associated infection, biofilm detection, *crystal violet*, *Acinetobacter baumannii*

## Pendahuluan

Biofilm merupakan suatu substansi biologi yang tersusun atas matriks polimer protein atau polisakarida, yang dapat mengandung sekumpulan bakteri sejenis maupun yang berbeda jenis.<sup>(1)</sup> Bakteri yang membentuk biofilm ini pada dasarnya memiliki kemampuan untuk mengubah cara hidupnya, dari bakteri yang sifatnya *free-living* menjadi bakteri yang menempel di suatu permukaan padat, sesuai kondisi lingkungannya.<sup>(2)</sup> Biofilm dapat dijumpai di manapun, termasuk di permukaan peralatan medis yang menempel pada pasien, seperti kateter urin atau kateter intravena.<sup>(3)</sup> Lapisan biofilm ini akan memberikan perlindungan terhadap bakteri yang ada di dalamnya dari berbagai kondisi ekstrim yang mengancam, seperti tingkat pH, osmolaritas, defisiensi nutrisi, serta paparan antibiotik.<sup>(4)</sup>

Infeksi terkait biofilm menimbulkan keresahan di fasilitas-fasilitas perawatan kesehatan di seluruh dunia.<sup>(5)</sup> Mikroba penghasil biofilm sangat resisten terhadap antibiotik dan mampu bertahan dari sistem imun pejamu.<sup>(6)</sup> Resistensi terhadap paparan antibiotik pada bakteri penghasil biofilm dapat terjadi melalui beberapa mekanisme seperti produksi matriks glikokaliks, heterogenitas dalam hal laju pertumbuhan dan metabolisme bakteri, *quorum sensing*, dan pompa efluks.<sup>(7)</sup>

*The National Institute of Health* baru-baru ini melaporkan, bahwa lebih dari 60% seluruh infeksi disebabkan oleh bakteri penghasil biofilm.<sup>(8)</sup>

*Acinetobacter baumannii* merupakan salah satu patogen multiresisten obat yang menjadi penyebab infeksi pada berbagai fasilitas kesehatan, terutama pada unit perawatan intensif. Lebih jauh lagi, *A. baumannii* juga dilaporkan sebagai bakteri penghasil biofilm dan memiliki kecenderungan menyebabkan infeksi yang berat.<sup>(9)(10)</sup>

Deteksi bakteri penghasil biofilm dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti Congo red Agar, metode tabung, *tissue culture plate* (TCP), mikroskop elektron dan mikroskop konfokal. Sayangnya, deteksi biofilm belum dapat dilakukan secara rutin karena berbagai keterbatasan, antara lain karena biofilm sulit dikembangkan secara *in vitro*.<sup>(11)</sup> Pemeriksaan dengan mikroskop elektron juga tidak dapat rutin dikerjakan karena tidak semua laboratorium di Indonesia memiliki mikroskop elektron. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan uji deteksi biofilm berbasis metode tabung yang mudah, *reproducible*, efisien, serta dapat dilakukan di laboratorium mikrobiologi sederhana. Selanjutnya juga dilakukan pengujian langsung pada isolat dari spesimen klinis, untuk mendapatkan gambaran proporsi

sampel yang positif menghasilkan biofilm pada kasus yang ditemukan di rumah sakit.

### Metode

Penelitian ini merupakan penelitian potong lintang berupa uji eksperimental. Deteksi pembentukan biofilm dilakukan dengan menggunakan metode tabung berbahan *polypropylene*, salah satu tabung yang mudah diperoleh di Indonesia. Optimasi dilakukan pada beberapa kondisi yaitu jenis media, masa inkubasi, bahan pencuci dari sisa sel planktonik serta konsentrasi crystal violet.

Metode deteksi pembentukan biofilm yang digunakan mengacu kepada metode Cernohorska dkk. yang telah dimodifikasi.<sup>(12)</sup> Isolat bakteri *A. baumannii* ATCC 19606 dan *P. aeruginosa* ATCC 10145, sebagai kontrol positif, serta *S. aureus* ATCC 25923, sebagai kontrol negatif, ditumbuhkan pada media agar Luria Bertani dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-24 jam. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri dipindahkan kedalam tabung berbahan dasar *polypropylene* yang mengandung kaldu yang berbeda, yaitu Luria Bertani, Luria Bertani ditambah glukosa 1%, *Tryptic Soy Broth*/TSB dan TSB ditambah glukosa 1% dan diinkubasi pada suhu 37 °C, *overnight*. Lama inkubasi dibedakan

menjadi dua, yaitu 24-30 jam dan 40-48 jam. Sebagai kontrol positif digunakan isolat, sedangkan kontrol negatif menggunakan.

Lapisan biofilm yang terbentuk kemudian dicuci menggunakan *Phosphat Buffer Saline*/PBS steril dan akuades steril dengan metode Christensen dkk. yang telah dimodifikasi.<sup>(13)</sup> Pencucian awal dilakukan sebanyak 3 kali, dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan *crystal violet* dengan konsentrasi 0,1% dan 1% selama 20 menit dan tabung dicuci kembali sebanyak 3-4 kali. Tabung dikeringkan dengan membalik tabung dan diletakkan pada suhu ruang.

Pembacaan hasil pembentukan biofilm dilakukan setelah tabung kering sempurna secara kualitatif dengan membandingkan hasil pewarnaan lapisan biofilm pada sampel dengan kontrol positif dan kontrol negatifnya. Hasil positif dinyatakan saat terbentuk lapisan berwarna ungu yang menempel pada permukaan dalam sampai dasar dinding tabung. Sedangkan hasil negatif dinyatakan apabila tidak terbentuk lapisan berwarna ungu pada permukaan dalam sampai dasar tabung, atau hanya terbentuk lapisan seperti cincin di sekitar permukaan dalam tabung.<sup>(12)(13)</sup>

Pengujian dilakukan sebanyak 4 tabung (quadruplo) dan dari 4 tabung yang diuji, dinyatakan positif jika semua

isolat terdeteksi penghasil biofilm. Setelah diperoleh kondisi ideal, pemeriksaan dilanjutkan dengan deteksi pembentukan biofilm pada 38 isolat bakteri *A. baumannii* multiresisten obat tersimpan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, Departemen Mikrobiologi FKUI-RSCM pada periode Maret 2015 hingga Oktober 2016. Pada penelitian ini tidak dilakukan perbandingan dengan deteksi biofilm menggunakan mikroskop elektron atau metode *tissue culture plate* karena keterbatasan biaya.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kasi etik dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan nomor 1066/UN2.F1/ETIK/XII/2015.

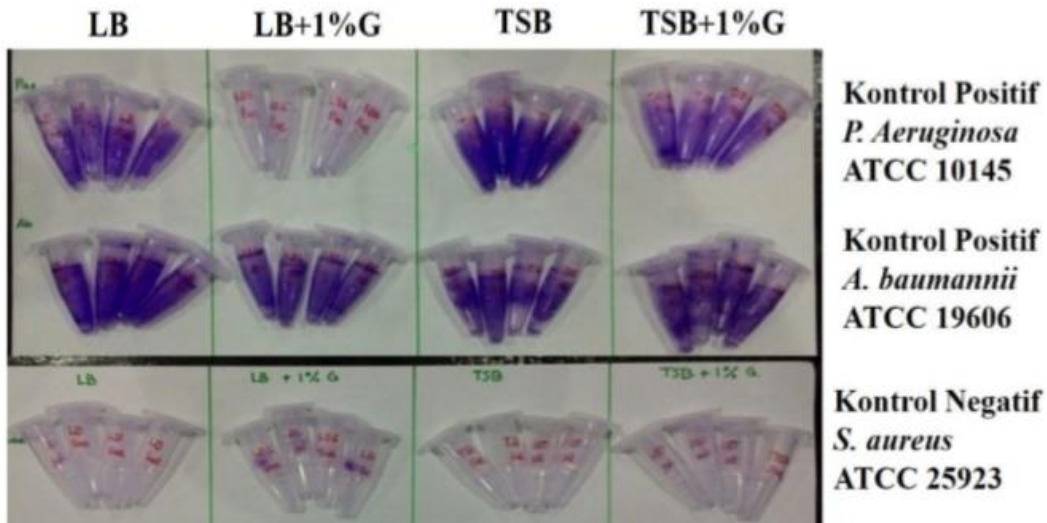
## Hasil

### a. Optimasi pembentukan biofilm dengan metode tabung

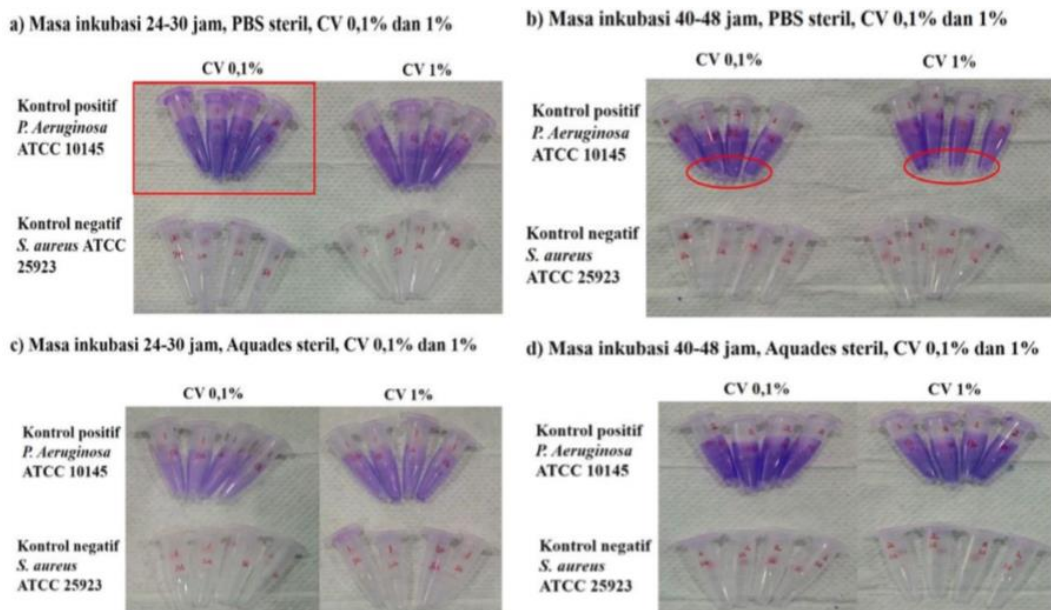
Pada tahap awal penelitian, optimasi deteksi pembentukan biofilm berbasis metode tabung dilakukan pada media biakan yang digunakan, yaitu pada media LB, LB dengan penambahan 1% glukosa, TSB, serta TSB dengan penambahan 1% glukosa. Pada pembacaan hasil, diperoleh pembentukan biofilm pada kontrol positif dan tidak terdapat pembentukan biofilm pada kontrol negatif. Penggunaan media LB dan TSB memberikan hasil

pembentukan biofilm yang dapat dinilai dengan baik pada kedua bakteri kontrol positif. Namun, hasil yang paling baik diperoleh pada penggunaan media LB yang memberikan hasil pembentukan biofilm yang homogen dengan intensitas yang kuat. (Gambar 1) Pembentukan biofilm tampak berupa warna ungu yang merata dari dasar tabung hingga bagian atas/permukaan suspensi bakteri uji. Secara umum dapat disimpulkan bahwa pada optimasi media diperoleh hasil intensitas warna terbaik secara berurutan pada LB, diikuti oleh TSB dan TSB+1%G. Sedangkan penggunaan media LB+1%G tidak memberikan hasil positif pada bakteri kontrol positif *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Selanjutnya, optimasi dilakukan pada detail teknis berupa jumlah isolat bakteri yang diuji, masa inkubasi pembentukan biofilm, bahan pencuci serta konsentrasi zat warna *crystal violet*. Tahap optimasi lanjutan ini dilakukan dengan menggunakan media LB yang memberikan hasil paling baik pada optimasi awal. Pada penilaian secara kualitatif diperoleh hasil yang adekuat pada kondisi inokulum bakteri sebanyak 1 *loop* penuh, masa inkubasi 24-30 jam, pencucian dengan PBS steril dan pewarnaan menggunakan *crystal violet* 0,1% (Gambar 2).



Gambar 1. Optimasi 4 jenis media cair: Luria bertani (LB), LB+glukosa 1%, *tryptone soya broth* (TSB), TSB+glukosa 1% dengan kontrol positif : *P. aeruginosa* ATCC 10145 dan *A. baumannii* ATCC 19606, kontrol negatif : *S. aureus* ATCC 25923. Tampak hasil pembentukan biofilm yang homogen pada penggunaan media Luria Bertani, yang ditandai dengan warna ungu yang pekat dari dasar hingga bagian atas tabung/bata permukaan suspensi bakteri.



Gambar 2. Optimasi metode tabung menggunakan media LB pada berbagai kondisi terhadap *P. aeruginosa* ATCC 10145 dan *S. aureus* ATCC 25923. Kotak merah merupakan hasil kondisi optimal yang didapatkan yaitu inkubasi 24 jam-30 jam , PBS steril dan konsentrasi CV 0,1% . Lingkaran merah menunjukkan lapisan sel biofilm yang terbentuk tidak utuh pada dasar tabung. Hasil deteksi pembentukan biofilm: *P. aeruginosa* ATCC 10145 (positif) dan *S. aureus* ATCC 25923 (negatif)

## **b. Proporsi pembentukan biofilm pada isolat *A. Baumannii***

Dari 38 isolat *A. baumannii* yang diperoleh selama periode penelitian, hasil biofilm positif ditemukan pada 55.3% (21 isolat). Spesimen terbanyak berasal dari sputum (57.9%), diikuti BAL (15.8%), darah (13,2%), dan swab luka (7.9%).

Sedangkan berdasarkan pola resistensi antibiotik, tampak sebaran isolat yang resisten terhadap antibiotik cephalosporin, carbapenem, aminoglikoside dan flouoroquinolone, masing-masing secara berurutan adalah 57.9%-100%, 97.4%-100%, 84.2%-94.7%, dan 57.9%-100%.

## **Pembahasan**

### **a. Optimasi pembentukan biofilm dengan metode tabung**

Media luria bertani (LB) merupakan salah satu media yang paling sering digunakan dalam uji biofilm. Pada optimasi ditemukan bahwa media LB memberikan hasil yang konsisten untuk deteksi biofilm, baik pada kontrol positif maupun kontrol negatif. Media ini mudah diperoleh di Indonesia dan merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan semua jenis spesies bakteri. NaCl sebagai salah satu zat penyusun media ini merupakan zat nutrisi yang dibutuhkan untuk pembentukan biofilm. Penambahan

NaCl sebagai suplemen pada medium dasar untuk menstimulasi pembentukan biofilm telah banyak dilaporkan,<sup>(14)</sup> oleh karena itu, media LB dipilih sebagai media pertumbuhan pada uji pembentukan biofilm dibandingkan media yang lainnya, seperti media TSB, BHI dan Mueller Hinton.

Selanjutnya optimasi dilakukan pada beberapa kondisi, yaitu masa inkubasi statis 24-30 jam dan 40-48 jam, bahan pencucian dengan PBS steril dan akuades steril serta konsentrasi zat pewarna *crystal violet* 0,1% dan 1%. Penilaian secara kualitatif dilakukan pada kondisi optimasi yang diterapkan, dan diperoleh hasil yang adekuat pada kondisi masa inkubasi statis 24-30 jam, pencucian dengan PBS steril dan pewarnaan menggunakan *crystal violet* 0,1%.

Lamanya inkubasi merupakan salah satu faktor penting dalam pembentukan biofilm, karena densitas biofilm akan meningkat dengan lamanya inkubasi.<sup>(14)</sup> Optimasi masa inkubasi yang dilakukan adalah membandingkan antara masa inkubasi 24 -30 jam dan 40-48 jam. Densitas biofilm pada isolat *P. aeruginosa* ATCC 10145 dengan masa inkubasi 40-48 jam tampak lebih padat dibandingkan masa inkubasi 24-30 jam, namun lapisan biofilm pada dasar tabung terlihat tidak utuh jika dibandingkan dengan lapisan yang

terbentuk pada masa inkubasi 24 jam – 30 jam. (Gambar 2). Sehingga, masa inkubasi yang optimal diperoleh pada rentang 24 -30 jam, yaitu 30 jam. Hasil ini tidak jauh berbeda pada beberapa penelitian terdahulu<sup>(12)(15)</sup>, meskipun diperoleh ketidaksesuaian dengan penelitian lain yang menyatakan pembentukan biofilm terjadi pada inkubasi selama 48 jam.<sup>(16)</sup>

Bahan pencuci yang digunakan adalah *phosphate buffer saline* (PBS: pH 7,2-7,4) dan aquades steril. Bahan pencuci yang memberikan hasil yang optimal adalah PBS steril. PBS memiliki tingkat perbedaan osmolaritas yang rendah, sehingga kemungkinan sel akan hancur dan mati saat pencucian dengan PBS sangat kecil, jika dibandingkan dengan aquades. Ini terbukti pada hasil optimasi bahan pencuci yang kami gunakan dimana tabung yang dicuci dengan PBS memberikan hasil pembentukan biofilm yang baik dan utuh setelah diwarnai dengan *crystal violet* jika dibandingkan dengan tabung yang dicuci dengan aquades, pembentukan biofilm cenderung lebih tipis dan sebagian terdapat sel-sel yang rusak. Secara umum sebagian besar studi biofilm menggunakan PBS sebagai bahan pencucinya,<sup>(12)(13)(17)</sup> sedangkan pertimbangan terkait penggunaan aquades karena ketersediaannya

banyak dan murah namun tidak dapat memberikan hasil yang setara.

Optimasi zat pewarna dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi *crystal violet* (CV) yang memberikan hasil optimal. Meskipun CV tidak selektif seperti halnya *alcian blue* dalam mewarnai mukopolisakarida, namun CV dapat mewarnai sel bakteri tanpa mewarnai materi berlendir lainnya (slimy material) yang melekat pada dinding tabung.<sup>(14)</sup> Pada penelitian ini konsentrasi CV yang dioptimasi adalah CV 0,1% dan CV 1%, yang merupakan tingkat konsentrasi yang sering digunakan untuk mewarnai biofilm. Hasil optimasi menunjukkan bahwa tidak tampak perbedaan hasil pewarnaan menggunakan kedua konsentrasi tersebut, sehingga pada penelitian ini, *crystal violet* 0,1% dipilih sebagai konsentrasi zat pewarnanya karena dapat memberikan hasil yang cukup signifikan dan penggunaannya sangat efisien. Selain itu, metode ini memiliki keunggulan dalam hal biaya dan kemudahan prosedur kerja dibanding dengan pemeriksaan menggunakan metode *microtiter plate*.

#### **b. Proporsi pembentukan biofilm pada isolat *A. Baumannii***

Pada deteksi pembentukan biofilm menggunakan isolat tersimpan *A. baumannii*, diperoleh proporsi yang

cukup tinggi, yaitu lebih dari lima puluh persen dari seluruh sampel. Isolat ini utamanya diperoleh dari spesimen saluran napas bawah, yaitu sputum dan bilasan bronkus. Studi yang dilakukan oleh Sanchez dkk. menunjukkan bahwa adanya hubungan yang antara asal spesimen dengan kemampuan membentuk biofilm, isolat yang berasal *nonfluid culture site* (mis. jaringan (dalam/superfisial), tulang dan saluran pernafasan) memiliki kemampuan pembentukan biofilm yang besar dibandingkan dengan isolat yang berasal dari *fluid culture site* (darah dan urin).<sup>(11)(18)</sup> Hubungan ini menunjukkan bahwa bakteri penghasil biofilm memiliki kemampuan untuk beradaptasi pada lingkungan yang non-likuid, sekaligus menjelaskan kesulitan untuk mengeradikasi beberapa kasus infeksi jika biofilm sudah terbentuk pada jaringan padat.<sup>(18)</sup>

Dari pola resistensi antibiotik, dapat diketahui bahwa seluruh isolat yang diujikan resisten terhadap lebih dari tiga golongan antibiotik yang merupakan pilihan terapi pada infeksi *A. baumannii*. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan dengan penelitian yang dilakukan oleh kaur dkk. yang menunjukkan proporsi isolat *A. baumannii* resisten multiobat penghasil biofilm sebesar 54.1% dengan metode tabung dari 74 berbagai isolat sampel klinis yang berasal dari

peralatan medis yaitu kateter vena sentral, kateter urin, ETT, *tracheostomy tubes* dan *chest drain tube tips* dari pasien rawat jalan dan rawat inap.<sup>(19)</sup> Hasil yang lebih rendah ditunjukkan dari penelitian yang dilakukan oleh de Campos. dkk yaitu sebesar 44% isolat *A. baumannii* resisten multiobat penghasil biofilm dengan metode tabung dari jumlah 16 isolat sampel klinis yang berasal dari pasien rawat inap di *Clinical Hospital of the Federal University of Uberlandia, Brazil*.<sup>(11)</sup> Sementara penelitian lain yang dilakukan oleh Saranathan dkk. memperlihatkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan penelitian ini yaitu proporsi isolat *A. baumannii* resisten multiobat penghasil biofilm sebesar 94% yang diperiksa secara kuantitatif dengan metode TCP dari 81 isolat yang berasal dari pasien di unit perawatan intensif RS PIMS India.<sup>(20)</sup> Diperlukan pemeriksaan menggunakan jumlah sampel yang lebih banyak untuk melihat hubungan statistik antara pola kepekaan antibiotik terhadap risiko produksi biofilm pada *A. baumannii*.

## Kesimpulan

Metode deteksi pembentukan menggunakan metode tabung yang dimodifikasi dan pewarnaan zat warna *crystal violet* 0,1% dapat dilakukan pada laboratorium tanpa memerlukan



peralatan khusus. Kondisi optimal pembentukan biofilm diperoleh pada penggunaan media Luria Bertani dengan besar inokulum 1 sengkelit penuh, lama inkubasi 30 jam dan pewarnaan dilakukan menggunakan *crystal violet* 0,1% serta bahan pembilas berupa PBS steril.

Diperolehnya proporsi *A. baumannii* multiresisten obat penghasil biofilm yang lebih dari lima puluh persen menjadi dasar yang kuat untuk melakukan deteksi pembentukan biofilm, terutama pada pasien dengan faktor risiko tinggi mengalami infeksi akibat bakteri penghasil biofilm seperti pasien yang menggunakan alat invasif dan mengalami perawatan jangka panjang. Deteksi pembentukan biofilm membantu dalam merumuskan tatalaksana yang adekuat pada pasien, terutama dari aspek pengendalian infeksi di rumah sakit.

### **Saran**

Penggunaan metode tabung dalam mendeteksi pembentukan biofilm dapat dilakukan pada setting laboratorium mikrobiologi klinik sederhana, sehingga seharusnya dapat dilakukan secara rutin pada dugaan infeksi yang disertai pembentukan biofilm. Selain itu diperoleh proporsi isolat *A. baumannii* penghasil biofilm yang cukup tinggi, diharapkan dapat dijadikan data awal

untuk pengembangan penelitian lanjutan dalam menguji pembentukan biofilm dengan metode tabung dari isolat klinis yang berasal dari berbagai macam peralatan medis di ruang ICU atau bangsal rawat inap dan dihubungkan dengan pilihan terapi dan pengendalian infeksi pada pasien.

### **Ucapan Terima Kasih**

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Hibah Risbin Iptekdok 2016 yang telah mendanai penelitian ini, serta berbagai pihak dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUI RSCM atas dukungan yang diberikan.

### **Daftar Pustaka**

1. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017;43(3):313–51.
2. Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2015;6(OCT):1–9.
3. Donlan RM. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1387–92.
4. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in

- microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2019.
5. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. Vol. 20, *Clinical Microbiology and Infection*. 2014. 1-55 p.
  6. Suwantarat N, Carroll KC. Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Southeast Asia. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2016;5(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-016-0115-6>
  7. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J*. 2017;11(1):53–62.
  8. Radji M, Fauziah S, Aribinuko N. Antibiotic sensitivity pattern of bacterial pathogens in the intensive care unit of Fatmawati Hospital, Indonesia. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(1):39–42.
  9. Karuniawati A, Saharman YR, Lestari DC. Detection of carbapenemase encoding genes in Enterobacteriace, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* isolated from patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. *Acta Med Indones*. 2013;
  10. de Campos PA, Royer S, da Fonseca Batistão DW, Araújo BF, Queiroz LL, de Brito CS, et al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. *Curr Microbiol*. 2016;
  11. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: Challenges and progress. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2008.
  12. Černohorská L, Votava M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(1):57–60.
  13. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*. 1982;37(1):318–26.
  14. Stepanović S, Vuković D, Hola V,

- Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;
15. Hanifi M. Penghambatan pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* dan *K. pneumoniae* oleh *E. coli* pengeksresi Peptida IDR-1018. University of Indonesia; 2015.
16. Singhai M, Malik A, Shahid M, Malik MA, Goyal R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J Glob Infect Dis*. 2012;
17. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian J Infect Dis*. 2011;15(4):305–11.
18. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1).
19. Kaur K, Kaur Gill A, Kaur Gill P, Kaur Heyar A. Antibiotic Resistance and Biofilm Formation Among Nosocomial Pathogens in a Tertiary Care Hospital. *J Evol Med Dent Sci*. 2017;6(84):5835–40.
20. Saranathan R, Vasanth V, Vasanth T, Shabareesh PRV, Shashikala P, Devi CS, et al. Emergence of carbapenem non-susceptible multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains of clonal complexes 103B and 92B harboring OXA-type carbapenemases and metallo- $\beta$ -lactamases in Southern India. *Microbiol Immunol*. 2015;59(5):277–84.