

ARTIKEL PENELITIAN

**POTENSI LAKTOFERIN SUSU SAPI SEBAGAI
ANTIBIOTIK TUNGGAL DAN KOMBINASI DENGAN SEFEPIM
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* SECARA *IN VITRO***

***COW'S MILK LACTOFERRIN AS AN ANTIMICROBIAL AGENT AND
SYNERGISTIC POTENTIAL WITH CEFEPIME AGAINST PSEUDOMONAS
AERUGINOSA IN VITRO***

Alver Prasetya¹, Sem Samuel Surja², Zita Arieselia^{3,*}

¹ Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya no. 2, Jakarta, 14440

² Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya no. 2, Jakarta, 14440

³ Departemen Farmakologi dan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya no. 2, Jakarta, 14440

* **Korespondensi:** zita.arieselia@atmajaya.ac.id

ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most frequently resistant bacteria to various antibiotics, so new antibiotics are needed. Cefepime is one of the antibiotics often used to treat resistant bacteria by inhibiting the formation of peptidoglycan. Cow's milk lactoferrin is a glycoprotein in milk with antimicrobial potential by binding to iron and damaging cell walls. Thus, there is a potential synergistic interaction between cefepime and lactoferrin in inhibiting *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, the aim of this study is to determine the antimicrobial potential of cow's milk lactoferrin and its potential interaction with cefepime in inhibiting *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: The bacterial sample used was *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The susceptibility test was conducted using *in vitro* disc diffusion and microdilution tests based on the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. Cefepime and blank disc were used as controls. A checkerboard method was used to determine the interaction between cow's milk lactoferrin and cefepime.

Results: In disc diffusion and microdilution tests, cow's milk lactoferrin could not inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. This has been done with various concentrations up to 0.5 g/ml. There was no interaction between cefepime and cow's milk lactoferrin in the checkerboard test.

Conclusion: Cow's milk lactoferrin could not inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *in vitro*

Key Words: cow's milk lactoferrin, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial agent

ABSTRAK

Pendahuluan: *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri yang paling sering resistan terhadap berbagai macam antibiotik, sehingga diperlukannya perkembangan antibiotik terbaru. Sefepim merupakan salah satu antibiotik yang sering digunakan dalam pengobatan terhadap bakteri resistan dengan menghambat pembentukan peptidoglikan. Laktoferin susu sapi merupakan glikoprotein pada susu yang memiliki potensi antimikroba dengan mengikat zat besi dan merusak dinding sel. Dengan demikian, terdapat potensi interaksi sinergisme antara sefepim dan laktoferin dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa*. Dengan demikian, tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui potensi antimikroba laktoferin susu sapi dan potensinya dengan sefepim dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa*.

Metode: Sampel bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Uji suseptibilitas dilakukan menggunakan uji difusi cakram dan mikrodilusi secara *in vitro* berdasarkan pedoman *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Sefepim dan cakram kosong digunakan sebagai kontrol. Untuk mengetahui interaksi antara laktoferin susu sapi dengan sefepim dilakukannya uji metode *checkerboard*.

Hasil: Pada uji difusi cakram dan mikrodilusi, laktoferin susu sapi tidak dapat menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hal ini sudah dilakukan dengan berbagai macam konsentrasi sampai dengan 0,5 g/ml. Pada uji *checkerboard* tidak ditemukan interaksi antara sefepim dan laktoferin susu sapi.

Simpulan: Laktoferin susu sapi tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara in vitro.

Kata Kunci: laktoferin susu sapi, *Pseudomonas aeruginosa*, antimikroba

PENDAHULUAN

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif yang sering ditemukan di lingkungan dan dapat menyebabkan infeksi pada seseorang yang memiliki status imunokompromi akibat berbagai macam kondisi kesehatan, antara lain seperti diabetes melitus, fibrosis kistik, dan kanker. Bakteri ini dapat menyebabkan berbagai macam penyakit yang terkait dengan tindakan medis seperti infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis, dan sepsis pada neonatus. Selain itu, *P. aeruginosa* juga dapat menyebabkan infeksi kulit terutama pada kulit yang terbakar dan infeksi saluran telinga luar pada perenang.¹ Data *Antibiotics Resistance Threats in the United States 2019* dari *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) menyatakan bahwa *P. aeruginosa* menyebabkan 32.600 kasus infeksi dan 2.700 kematian setiap tahunnya di Amerika Serikat.²

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang resistan terhadap berbagai macam antibiotik. Hal ini disebabkan karena *P. aeruginosa* memiliki resistensi intrinsik dan mampu mendapatkan karakteristik resistensi tambahan sehingga tidak mudah disembuhkan.³ *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri yang termasuk dalam *Bacterial Priority Pathogens List* (BPPL) dari *World Health Organization* (WHO) di tahun 2024.⁴ Dengan demikian, penelitian penemuan antimikroba baru untuk meningkatkan angka keberhasilan terapi terhadap infeksi

si *P. aeruginosa* sangat dibutuhkan.

Pseudomonas aeruginosa memiliki berbagai macam mekanisme resistensi sehingga resistensi dapat secara cepat terbentuk. Studi yang meneliti prevalensi *P. aeruginosa* yang resistan pada *intensive care unit* (ICU) menemukan bahwa 38,2% *P. aeruginosa* yang diisolasi resistan terhadap aminoglikosida, 49,3% terhadap karbapenem, 43,7% terhadap sefalosporin, 49,7% terhadap flourokuinolon, 36% terhadap piperasilin-tazobaktam dan tingkatan resistensi yang tinggi terhadap antibiotik lainnya.⁵

Sefepim merupakan antibiotik golongan beta-laktam yang sering dipakai pada infeksi dari lingkungan rumah sakit yang biasanya disebabkan oleh bakteri resistan seperti *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, dan *Enterobacteriaceae*. Struktur dari sefepim menyebabkan antibiotik ini resistan terhadap beta-laktamase yang diproduksi oleh gen AmpC, sehingga sefepim memiliki aktivitas yang tinggi terhadap *Enterobacter* dan *P. aeruginosa*. Namun, mekanisme resistensi lainnya tetap dapat menyebabkan resistensi, contohnya seperti pompa aktif efluks yang berada pada membran luar bakteri. Dengan demikian, zat yang dapat merusak integritas dari membran luar bakteri dapat berpotensi meningkatkan aktivitas sefepim.⁶

Laktoferin (LF) adalah suatu glikoprotein yang berada di dalam susu dan termasuk dalam keluarga transferin karena memiliki kemampuan untuk mengikat zat besi. Selain

berada di dalam susu, LF juga merupakan glikoprotein yang disekresikan oleh tubuh kita seperti yang terdapat pada air mata, air liur, cairan mukus, dan sekret genital. Laktoferin dari susu sapi dan dari air susu ibu memiliki sifat terapeutik yang luas.⁷ Penelitian Morici, *et al.* menemukan bahwa LF air susu ibu (ASI) dapat membunuh *Klebsiella pneumoniae* yang tidak resistan dan juga terhadap *multi-drug resistance* (MDR) *K. pneumoniae*. Seperti LF ASI, LF susu sapi ditemukan memiliki efek bakterisida terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang resistan antibiotik.⁸ Selain itu, LF juga memiliki efek sinergis dengan antibiotik dan mampu meningkatkan suseptibilitas bakteri terhadap antibiotik hidrofob.⁹ Hal ini dikarenakan LF dapat berikatan langsung terhadap komponen dinding sel bakteri sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel.¹⁰

Penelitian ini dilakukan untuk menyelidiki efek terapeutik LF dan aktivitas sinergisnya dengan sefepim terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Laktoferin merupakan glikoprotein yang secara alami terdapat di dalam susu maupun sekret tubuh kita, sehingga tidak akan menimbulkan efek samping dan juga tidak mahal. Peneliti menggunakan LF susu sapi karena lebih mudah untuk didapatkan dan diaplikasikan. Selain itu, penelitian mengenai potensi LF susu sapi sebagai terapi tunggal maupun kombinasi dengan antibiotik sefepim terhadap *P. aeruginosa* belum pernah dilakukan sehingga diharapkan penelitian ini dapat memperluas pengetahuan tentang potensi efek antibakteri dari LF susu sapi secara spesifik maupun secara luas.

METODE

Cakram LF dibuat dari isolat LF susu sapi 99% yang didapatkan dari *Xi'an Ruisaen Biotechnology Co., Ltd.* dengan cara menginkubasi cakram kosong pada larutan LF 0,5 g/ml selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, cakram LF digunakan pada uji difusi cakram terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan cakram sefepim 30 µg dan cakram kosong sebagai kontrol pada agar *Mueller-Hinton*. Uji yang dilakukan yaitu cakram difusi, mikrodilusi, dan uji *checkerboard*. Cakram difusi dilakukan untuk menguji karakteristik antimikroba LF terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Pada uji ini dilakukan penambahan cakram LF 0,5 gram dan antibiotik sefepim pada agar yang berbeda yang telah diinokulasi dengan *P. aeruginosa*. Setelah diinkubasi, dilakukan observasi terhadap zona inhibisi yang terbentuk di sekitar cakram LF dibandingkan dengan kontrol yaitu sefepim dan akuades. Uji mikrodilusi dilakukan untuk menentukan konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau yang disebut sebagai *minimum inhibitory concentration* (MIC). Metode mikrodilusi dengan memindahkan dan mencampur larutan dari *well* pertama ke *well* selanjutnya sampai *well* terakhir dengan prinsip dilusi berseri. Hal ini bertujuan untuk membentuk gradien konsentrasi zat yang akan diuji untuk menentukan MIC.¹¹⁻¹³ Konsentrasi LF pada uji mikrodilusi adalah sebesar 0,25 g/ml sampai dengan 244 µg/mL. Potensi sinergisme LF dengan sefepim diuji menggunakan uji *checkerboard*. Indeks *Fractional Inhibitory Concentration* (FIC) diguna-

kan untuk menentukan interaksi LF dengan sefepim. Interaksi dapat dikategorikan sebagai sinergis, aditif, atau antagonis.^{14,15}

HASIL

Laktoferin susu sapi 99% dan cakram ko-

song tidak membentuk zona inhibisi, sedangkan sefepim 30 µg membentuk zona inhibisi dengan rata-rata sebesar 26,7 mm. *P. aeruginosa* ATCC 27853 dapat dikatakan sensitif terhadap sefepim karena membentuk zona inhibisi ≥18 mm (Tabel 1 dan Gambar 1).

Tabel 1. Hasil Cakram Difusi terhadap *P. aeruginosa*

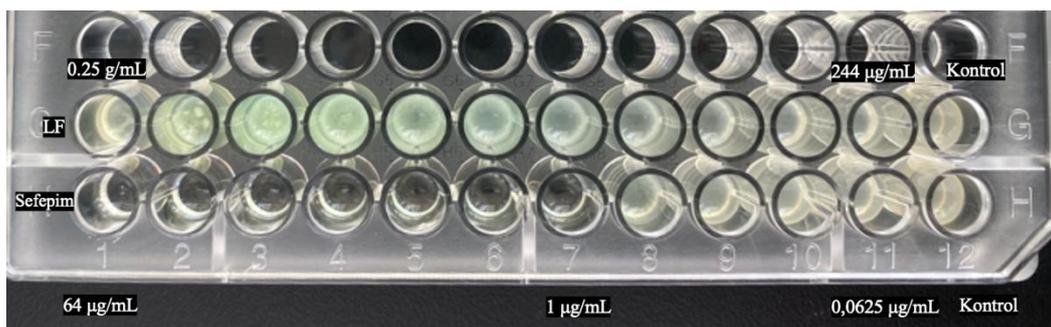
Zat Uji	Diameter Zona Inhibisi (mm)			
	1	2	3	Rata-rata
Laktoferin	0	0	0	0
Sefepim	25	27	28	26,7
Akuades	0	0	0	0



Gambar 1. Hasil Cakram Difusi terhadap *P. aeruginosa*

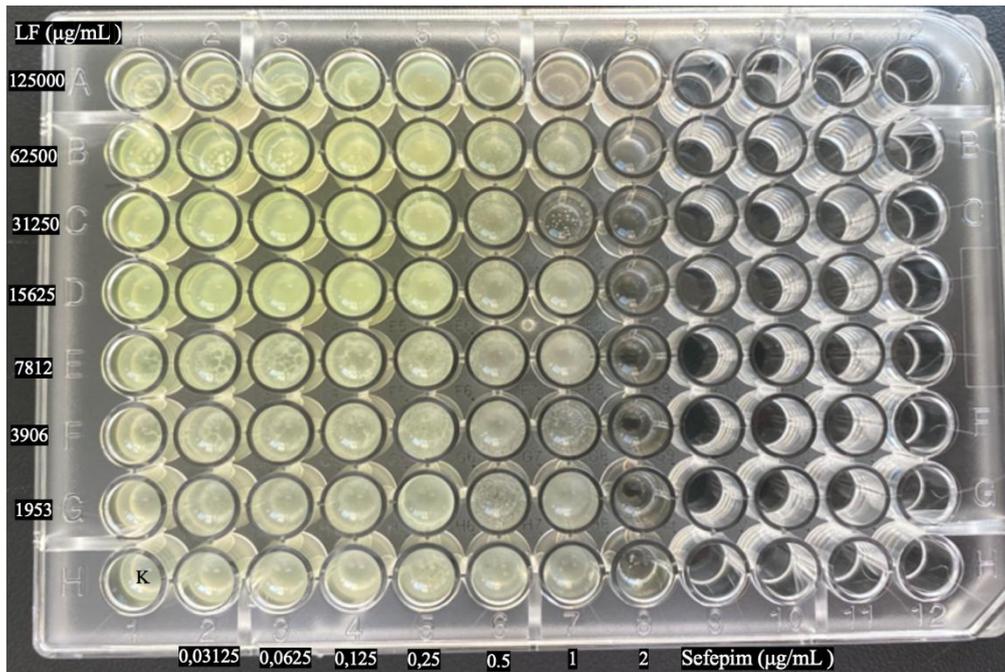
Tabel 2. Hasil Mikrodilusi terhadap *P. aeruginosa*

Zat Uji	MIC	
	Well terakhir yang tidak memiliki pertumbuhan	µg/mL
Laktoferin	-	-
Sefepim	7	1
Aquades	-	-



Gambar 2. Hasil Mikrodilusi terhadap *P. aeruginosa*

Potensi Laktoferin Susu Sapi sebagai Antibiotik Tunggal dan Kombinasi dengan Sefepim terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara In Vitro



Gambar 3. Hasil Uji *Checkerboard* terhadap *P. aeruginosa*

Uji mikrodilusi LF susu sapi 99% dengan konsentrasi terbesar 0,25 g/ml menunjukkan tidak ada penghambatan pertumbuhan bakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tabel 2). Hal ini dapat disimpulkan karena terlihat pertumbuhan bakteri di setiap *well*-nya (*well* LF pertama dengan konsentrasi 0,25 g/mL, *well* LF kedua dengan konsentrasi 0,125 g/mL, dan *well* selanjutnya memiliki $\frac{1}{2}$ konsentrasi *well* di sebelahnya karena diencerkan dengan prinsip dilusi berseri sampai *well* terakhir dengan konsentrasi 244 µg/mL; Gambar 2). Selain itu, ditemukan penemuan tambahan yaitu terlihat peningkatan pigmen yang berwarna hijau seiring meningkatnya konsentrasi LF. Mikrodilusi menggunakan sefepim memberikan MIC sebesar 1 µg/mL, dapat diartikan bakteri sensitif terhadap sefepim karena MIC ≤ 8 µg/mL sesuai dengan diterapkan pada uji mikrodilusi sefepim, yaitu konsentrasi terbesar adalah 64 µg/mL lalu diencerkan sampai *well*

terakhir (0,0625 µg/mL) (Gambar 2).

Uji mikrodilusi LF menunjukkan bahwa LF tidak memiliki daya hambat terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 sehingga konsentrasi LF yang harus digunakan pada uji ini tidak dapat ditemukan. Konsentrasi tertinggi pada uji *checkerboard* seharusnya menggunakan MIC pada uji mikrodilusi, tetapi peneliti mencoba menggunakan konsentrasi yang terbesar yang dapat dibuat. Uji sinergis *checkerboard* tidak menemukan interaksi antara sefepim dan LF. Konsentrasi LF pada baris A sebesar 125.000 µg/mL, baris B sebesar 62.500 µg/mL, dan baris selanjutnya memiliki $\frac{1}{2}$ baris di atasnya sampai baris G, sedangkan konsentrasi sefepim dapat dilihat pada kolom 2 sampai 8 dan *well* K merupakan kontrol (Gambar 3). Penghambatan hanya dapat dilihat pada kolom ke-8 yang mengandung sefepim 2 µg/mL. Hal ini berbeda dengan MIC pada uji mikrodilusi, tetapi tetap menunjukkan

hasil sensitif karena MIC ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$. Peneliti juga menemukan adanya peningkatan produksi pigmen seiring meningkatnya konsentrasi LF pada uji ini.

DISKUSI

Uji difusi cakram dan mikrodilusi menunjukkan bahwa LF secara konsisten tidak dapat menghambat *P. aeruginosa* ATCC 27853. Kedua uji telah lakukan sebanyak dua kali pengulangan menggunakan konsentrasi mulai dari 0,05 mg/ml sampai 0,5 g/ml, tetapi hasil yang didapatkan tetap sama. Konsentrasi LF 0,05 mg/ml digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya dan 0,5 g/ml merupakan konsentrasi yang terbesar yang dapat larut.^{16,17} Penelitian sebelumnya yang meneliti LF terhadap *P. aeruginosa* memiliki hasil yang kontradiktif. Singh, *et al.* menemukan bahwa LF susu sapi memiliki MIC sebesar 1 mg/ml terhadap *P. aeruginosa* ATCC 9027, sedangkan Al-Mogbel, *et al.* mengatakan LF susu sapi tidak dapat menghambat *Carbapenemase producing - P. aeruginosa*.^{16,17} Materi genetik *P. aeruginosa* ATCC 27853 memiliki jumlah gen yang lebih banyak dibandingkan *P. aeruginosa* ATCC 9027, sehingga hal ini kemungkinan dapat menjadi alasan dari perbedaan kerentanan terhadap LF.^{18,19} Meskipun demikian, gen spesifik yang berperan tidak dapat ditentukan.¹⁶

Penelitian ini juga menemukan bahwa LF tidak memiliki efek sinergisme bersama dengan sefepim. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian dari Al-Mogbel, *et al.* yang menyatakan pemberian LF bersama aminoglikosida dapat menurunkan MIC dari beberapa macam

antibiotik terhadap MDR *P. aeruginosa* dan bakteri resistan lainnya. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Andrés, *et al.* menemukan bahwa LF dapat menyebabkan toleransi antibiotik terhadap *P. aeruginosa*.²⁰

Cukup banyak penelitian yang mendeskripsikan efek anti-*biofilm* LF secara konsisten terhadap *P. aeruginosa*. Penelitian Kamiya, *et al.*, O'May, *et al.*, dan Al-Mogbel, *et al.* menyimpulkan LF memiliki efek anti-*biofilm* yang signifikan terhadap *P. aeruginosa*, walaupun tidak menghambat pertumbuhannya.^{16,21,22} Rogan, *et al.* menunjukkan bahwa penurunan kadar LF akibat inflamasi dalam sampel sputum pasien yang terinfeksi *P. aeruginosa* berkorelasi dengan produksi biofilm.²³ Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bakteri terhadap sistem imun dan juga antibiotik, sehingga LF berpotensi menjadi terapi ajukan.²⁴

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ditemukan sebagian *strain* dari *P. aeruginosa* menunjukkan kerentanan terhadap LF, tetapi berdasarkan penelitian ini LF tidak memiliki daya hambat terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Selain itu, kemampuan LF untuk menghambat pembentukan biofilm ditemukan secara konsisten di banyak studi. Hal ini dapat menjadi indikator bagi penelitian selanjutnya untuk berfokus ke aspek tersebut.

Pseudomonas aeruginosa membutuhkan zat besi untuk pertumbuhannya dan memiliki berbagai macam strategi untuk memperoleh zat besi. Salah satunya adalah melalui pyoverdinin dan pyochelin yang merupakan molekul siderofor yang dapat meningkatkan zat besi. Siderofor akan diproduksi dalam jumlah yang

banyak pada lingkungan yang rendah zat besi.²⁵ Hal ini dapat menjelaskan terjadinya peningkatan produksi pigmen seiring meningkatnya konsentrasi LF pada penelitian ini. Meskipun LF tidak dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* secara sempurna, LF dapat menurunkan kadar zat besi di sekitar bakteri sehingga menekan pertumbuhannya.²⁶

Penelitian ini menggunakan LF susu sapi dengan kemurnian 99% sehingga risiko adanya zat lain yang memengaruhi hasil sangatlah kecil. Selain itu, kontrol positif dan negatif menunjukkan hasil yang semestinya. Uji mikrodilusi dan cakram difusi dilakukan sebanyak dua kali untuk mengkonfirmasi hasilnya dan hasil yang ditemukan tetap konsisten.

Keterbatasan penelitian ini antara lain kualitas LF susu sapi yang diperoleh tidak diperiksa lebih lanjut kualitasnya dan hanya melihat hasil analisa dari pembuat. Selain itu, sampel bakteri hanya berasal dari satu strain, sehingga hasil tidak merepresentasikan strain lainnya. Hasil hanya dinilai pada satu jarak waktu yaitu setelah 24 jam inkubasi, sehingga perubahan jumlah bakteri per waktunya tidak diketahui. Penelitian ini merupakan penelitian in vitro sehingga hasilnya tidak dapat diambil sebagai kesimpulan.

SIMPULAN

Laktoferin susu sapi tidak dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* ATCC 27853 pada uji cakram difusi dan mikrodilusi. Uji *checkerboard* dengan sefepim menunjukkan tidak adanya sinergisme laktoferin susu sapi. Penelitian ini menemukan adanya pe-

ningkatan produksi pigmen oleh *P. aeruginosa* ATCC 27853 seiring bertambahnya konsentrasi laktoferin susu sapi. Hal ini menandakan laktoferin susu sapi tetap dapat menurunkan kadar zat besi yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 28th ed. New York: McGraw Hill Education; 2019.
2. US Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
3. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177–92.
4. Antimicrobial Resistance Division (AMR), Impact Initiatives and Research Coordination (IRC). Bacterial priority pathogens list 2024: Bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2024.
5. Ribeiro AC da S, Crozatti MTL, Silva AA da, Macedo RS, Machado AM de O, Silva AT de A. *Pseudomonas aeruginosa* in the ICU: prevalence, resistance profile, and antimicrobial consumption. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20180498.
6. Brunton LL, Knollmann BC, Hilal-Dandan R, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Thirteenth edition. New York: McGraw Hill Medical; 2018. 1419 p.
7. Vogel HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol.* 2012;90(3):233–44.
8. Flores-Villaseñor H, Canizalez-Román A, Reyes-Lopez M, Nazmi K, de la Garza M, Zazueta-Beltrán J, et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals.* 2010;23(3):569–78.

9. Morici P, Florio W, Rizzato C, Ghelardi E, Tavanti A, Rossolini GM, et al. Synergistic activity of synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin in combination with various antibiotics against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(10):1739–48.
10. Moreno-Expósito L, Illescas-Montes R, Melguizo-Rodríguez L, Ruiz C, Ramos-Torrecillas J, de Luna-Bertos E. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life Sci*. 2018 Feb 15;195:61-4.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: CLSI; 2015.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: CLSI; 2015.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2020.
14. Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
15. Perumal S, Mahmud R, Mohamed N. Combination of Epicatechin 3-Gallate from *Euphorbia hirta* and cefepime promotes potential synergistic eradication action against resistant clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018 Jul 11;2018:5713703.
16. Al-Mogbel MS, Menezes GA, Elabbasy MT, Alkhulaifi MM, Hossain A, Khan MA. Effect of synergistic action of bovine lactoferrin with antibiotics on drug resistant bacterial pathogens. *Medicina*. 2021;57(4):343.
17. Singh J, Vijayan V, Ahmedi S, Pant P, Manzoor N, Singh TP, et al. Lactosmart: A novel therapeutic molecule for antimicrobial defense. *Front Microbiol*. 2021;12:672589.
18. ATCC. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853TM): Product Sheet. 2019.
19. ATCC. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027TM): Product Sheet. 2019.
20. Andrés MT, Viejo-Diaz M, Pérez F, Fierro JF. Antibiotic tolerance induced by lactoferrin in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1613–6.
21. Kamiya H, Ehara T, Matsumoto T, Kamiya H. Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *JIC*. 2012;18(1):47–52.
22. O'May CY, Sanderson K, Roddam LF, Kirov SM, Reid DW. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *J Med Microbiol*. 2009;58(6):765–73.
23. Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2004;190(7):1245–53.
24. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*. 2014;68(1):1–12.
25. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Nov 14;3:75
26. Jahani S, Shakiba A, Jahani L. The antimicrobial effect of lactoferrin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int J Infect*. 2015;2(3).