

Studi Molekuler Gen Penyandi Enzim *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL), *β -Lactamase AmpC*, dan Karbapenemase pada Isolat Klinis *Multi-drug Resistant* (MDR) *Klebsiella pneumoniae* di RSUP Sanglah, Denpasar

GNR Suwardana^{1*}, NMA Tarini², NND Fatmawati²

1. Program Studi Pendidikan Dokter FK UNUD

2. Departemen/SMF Mikrobiologi Klinik FK UNUD/RSUP Sanglah

* e-mail : rsi_suwardana@yahoo.com

ABSTRAK

Klebsiella pneumoniae adalah salah satu bakteri penyebab *hospital acquired infections* (HAIs) dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Tingginya beban kesehatan akibat infeksi *K. pneumoniae* utamanya diakibatkan oleh sifat resistensi terhadap banyak golongan antibiotik (multi-resisten), termasuk resistensi terhadap antibiotik golongan mutakhir seperti sefalosporin generasi ketiga dan karbapenem. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengonfirmasi keberadaan gen penyandi enzim *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL), *β -Lactamase AmpC*, dan karbapenemase pada isolat klinis multi-resisten *K. pneumoniae*. Lima isolat klinis multi-resisten *K. pneumoniae* terdeteksi secara fenotip menggunakan uji Vitek Compact 2 (Biomereux®), kemudian teknik *polymerase chain reaction* (PCR) digunakan untuk mendeteksi adanya gen *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* sebagai gen penyandi ESBL, *bla_{FOX}* sebagai gen penyandi AmpC, dan *bla_{KPC}* serta *bla_{NDM-1}* sebagai gen penyandi karbapenemase. Penelitian ini menemukan bahwa 4 dari 5 sampel positif memiliki gen penyandi ESBL, yakni 2 sampel dengan *bla_{CTX-M}*, sedangkan 2 sampel lainnya didapatkan dual gen *bla_{SHV}* dan *bla_{TEM}*. Tidak ditemukan adanya gen penyandi AmpC maupun karbapenemase pada semua sampel. Sifat multi-resistensi pada isolat klinis *K. pneumoniae* kemungkinan diakibatkan karena adanya gen penyandi *β -lactamase*, sedangkan resistensi terhadap karbapenem kemungkinan besar terjadi bukan karena adanya gen penyandi karbapenemase, namun dimungkinkan adanya mekanisme resistensi yang lain.

Kata kunci : *K. pneumoniae*, multi-resistensi, ESBL, AmpC, karbapenemase

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is type of bacteria that mainly caused *hospital acquired infections* (HAIs) with high morbidity and mortality. *K. pneumoniae* was termed as superbug due its multi-drug resistant profile to many common antibiotics, including the newest third generation of cephalosporin and carbapenem. This study was conducted to confirm the existence of resistance genes that encodes the *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) enzymes, *β -Lactamase AmpC*, and carbapenemase from clinical isolate multi-drug resistant *K. pneumoniae*. Five *K. pneumoniae* isolates with multi-drug resistant profiles were tested by Vitek Compact 2 (Biomereux®), then *polymerase chain reaction* (PCR) was used to detect *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* genes that produce ESBL enzyme, *bla_{FOX}* for

AmpC, *bla_{KPC}* and *bla_{NDM-1}* genes for carbapenemase. This study found four samples were positive for ESBL genes (two samples with *bla_{CTX-M}* and two with dual genes *bla_{SHV}* and *bla_{TEM}*). All samples were negative for *bla_{FOX}*, *bla_{KPC}*, dan *bla_{NDM-1}* genes. *K. pneumoniae*'s multi-drug resistant profile might caused by the existance of gene that produces β -lactamase. Meanwhile, there are another mechanisms for carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, beyond the existance of gene that encodes carbapenemase.

Keywords : *K. pneumoniae*, multi-drug resistant, ESBL, AmpC, carbapenemase

PENDAHULUAN

Salah satu spesies bakteri yang menjadi penyebab utama kasus-kasus *Hospital Acquired Infections* (HAIs) adalah *Klebsiella pneumoniae*. Kasus HAIs akibat *K. pneumoniae* menjadi salah satu faktor risiko meningkatnya angka morbiditas dan mortalitas pasien, memperpanjang waktu perawatan dan menambah pengeluaran biaya perawatan (*cost of expenditure*).^{1,2}

Tingginya beban kesehatan pada infeksi *K. pneumoniae* terjadi karena sifat resistensi terhadap banyak golongan antibiotik atau sering disebut multi-resisten (*multi-drug resistant*). Sifat resistensi yang dimiliki oleh *K. pneumoniae* umumnya disebabkan oleh enzim *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL), dan β -Lactamase AmpC yang mampu menghidrolisis antibiotik jenis β -Lactam.³

Pada beberapa kasus infeksi berat akibat *K. pneumoniae* penghasil ESBL atau AmpC, antibiotik yang menjadi

pilihan utama adalah karbapenem.²

Namun, beberapa laporan klinis menyebutkan adanya sifat resistensi terhadap karbapenem akibat produksi enzim karbapenemase yang juga mampu menghidrolisis antibiotik golongan karbapenem.^{4,5}

Keberadaan enzim-enzim yang mampu menghidrolisis banyak golongan antibiotik sangat penting untuk dikonfirmasi baik secara fenotip dan genotip, utamanya menyangkut pilihan terapi yang efektif bagi pasien serta surveilans kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan gen-gen penyandi ESBL, AmpC, dan karbapenemase pada isolat klinis *K. pneumoniae* di RSUP Sanglah, Denpasar-Bali.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan teknik potong lintang (*cross-sectional*), dengan waktu penelitian

dimulai dari April hingga November 2015. Penelitian ini dilaksanakan di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana (FK UNUD).

Sampel pada penelitian ini menggunakan isolat *K. pneumoniae* dengan profil multi-resisten melalui uji Vitek Compact 2 (Biomeriux®) dari semua spesimen klinis yang diperoleh di Laboratorium Mikrobiologi Klinik

RSUP Sanglah tahun 2015. Sampel penelitian diambil dengan metode *consecutive sampling* dengan jumlah isolat yang ditemukan sebanyak 5 isolat. Sampel *K. pneumoniae* dipastikan terlebih dahulu dengan mendeteksi gen 16s RNA, sedangkan gen resistensi yang diteliti pada penelitian ini yakni *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, dan *bla_{CTX-M}* sebagai penyandi ESBL, *bla_{FOX}* sebagai penyandi AmpC, *bla_{KPC}* dan *bla_{NDM-1}* sebagai penyandi gen karbapenamase.

Tabel 1. Deskripsi primer (16sRNA, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{FOX}*, *bla_{KPC}*, dan *bla_{NDM-1}*).

Gen	Primer	Sequence		Annealing (waktu/suhu)	Panjang Basa (base pair)	Sitasi																																																								
		Forward 5'→3'	Reverse 3'→5'																																																											
16s RNA	Forward	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG		30 detik/55 °C	1,5 kilo bp	6																																																								
	Reverse	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT					<i>Bla_{SHV}</i>	Forward	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG		30 detik/55 °C	862 bp	7,8	Reverse	AGC GTT GCC AGT GCT CGA TC		<i>Bla_{TEM}</i>	Forward	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG		60 detik/55 °C	858 bp	7,8	Reverse	CCA ATG CTT ATT CAG TGA GG		<i>Bla_{CTX-M}</i>	Forward	SCS ATG TG CAGY ACC AGT AA		60 detik/55 °C	585 bp	7,8	Reverse	ACC AGA AYW AGC GGB GC		<i>Bla_{FOX}</i>	Forward	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		30 detik/55 °C	190 bp	9	Reverse	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		<i>Bla_{KPC}</i>	Forward	TCG AAC AGG ACT TTG GCG		30 detik/55 °C	201 bp	10	Reverse	GGA ACC AGC GCA TTT TTG C		<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp
<i>Bla_{SHV}</i>	Forward	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG		30 detik/55 °C	862 bp	7,8																																																								
	Reverse	AGC GTT GCC AGT GCT CGA TC					<i>Bla_{TEM}</i>	Forward	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG		60 detik/55 °C	858 bp	7,8	Reverse	CCA ATG CTT ATT CAG TGA GG		<i>Bla_{CTX-M}</i>	Forward	SCS ATG TG CAGY ACC AGT AA		60 detik/55 °C	585 bp	7,8	Reverse	ACC AGA AYW AGC GGB GC		<i>Bla_{FOX}</i>	Forward	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		30 detik/55 °C	190 bp	9	Reverse	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		<i>Bla_{KPC}</i>	Forward	TCG AAC AGG ACT TTG GCG		30 detik/55 °C	201 bp	10	Reverse	GGA ACC AGC GCA TTT TTG C		<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp	10	Reverse	CTT CCT ATC TCG ACA TGC CG							
<i>Bla_{TEM}</i>	Forward	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG		60 detik/55 °C	858 bp	7,8																																																								
	Reverse	CCA ATG CTT ATT CAG TGA GG					<i>Bla_{CTX-M}</i>	Forward	SCS ATG TG CAGY ACC AGT AA		60 detik/55 °C	585 bp	7,8	Reverse	ACC AGA AYW AGC GGB GC		<i>Bla_{FOX}</i>	Forward	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		30 detik/55 °C	190 bp	9	Reverse	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		<i>Bla_{KPC}</i>	Forward	TCG AAC AGG ACT TTG GCG		30 detik/55 °C	201 bp	10	Reverse	GGA ACC AGC GCA TTT TTG C		<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp	10	Reverse	CTT CCT ATC TCG ACA TGC CG																	
<i>Bla_{CTX-M}</i>	Forward	SCS ATG TG CAGY ACC AGT AA		60 detik/55 °C	585 bp	7,8																																																								
	Reverse	ACC AGA AYW AGC GGB GC					<i>Bla_{FOX}</i>	Forward	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		30 detik/55 °C	190 bp	9	Reverse	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		<i>Bla_{KPC}</i>	Forward	TCG AAC AGG ACT TTG GCG		30 detik/55 °C	201 bp	10	Reverse	GGA ACC AGC GCA TTT TTG C		<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp	10	Reverse	CTT CCT ATC TCG ACA TGC CG																											
<i>Bla_{FOX}</i>	Forward	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		30 detik/55 °C	190 bp	9																																																								
	Reverse	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG					<i>Bla_{KPC}</i>	Forward	TCG AAC AGG ACT TTG GCG		30 detik/55 °C	201 bp	10	Reverse	GGA ACC AGC GCA TTT TTG C		<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp	10	Reverse	CTT CCT ATC TCG ACA TGC CG																																					
<i>Bla_{KPC}</i>	Forward	TCG AAC AGG ACT TTG GCG		30 detik/55 °C	201 bp	10																																																								
	Reverse	GGA ACC AGC GCA TTT TTG C					<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp	10	Reverse	CTT CCT ATC TCG ACA TGC CG																																															
<i>Bla_{NDM-1}</i>	Forward	GCA TAA GTC GCA ATC CCC G		30 detik/55 °C	237 bp	10																																																								
	Reverse	CTT CCT ATC TCG ACA TGC CG																																																												

Isolasi DNA bakteri menggunakan kit *High Pure Purification* (Roche® *Singapore*), dan PCR dikerjakan menggunakan Go Green Taq (Promega®) sebanyak 35 kali siklus. Konsentrasi masing-masing primer *forward* dan *reverse* adalah 0,3 µL, sedangkan konsentrasi cetakan DNA yang digunakan sebesar 0,4 µL. Tahapan elektroforesis menggunakan agarose dengan konsentrasi 1%, selama 45 menit (*Electrophoresis system*, Mupid-Exu™).

HASIL

Kelima sampel isolat klinis *K. pneumoniae* (pus [n=2]; urin [n=2]; lain-lain [n=1]) dari Instalasi Mikrobiologi Klinis RSUP Sanglah memperlihatkan profil multi-resisten

secara fenotip dengan uji Vitek Compact 2 (Biomeriux®). Tiga dari lima sampel yang diteliti menunjukkan profil positif penghasil ESBL dengan uji fenotip.

Uji genotip menggunakan PCR didapatkan bahwa kelima sampel menunjukkan adanya pita (*band*) positif pada gen penyandi 16s RNA. Gen penyandi ESBL ditemukan positif pada empat dari lima sampel penelitian. Dua sampel menunjukkan adanya *co-existence* antara gen *bla_{SHV}* dan *bla_{TEM}*, sementara gen tunggal *bla_{CTX-M}* ditemukan positif pada dua sampel yang digunakan. Semua sampel menunjukkan hasil negatif terhadap gen penyandi AmpC, dan karbapenemase (tabel 3).

Tabel 2. Profil Uji Sensitivitas Antibiotik Pada Isolat Klinis Multi-resistensi *K. pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah.

Nomor isolat	Profil ESBL	Ceftazadime	Cefepime	Aztreonam	Kotrimoksazol	Ciprofloksasin	Tetrasiklin	Gentamisin	Amoksisilin + Asam Klavulanat	Meropenem
Ps-33	(+)	R	I	R	R	I	R	R	R	R
Ps-55	(+)	R	R	R	R	R	N/A	R	N/A	R
L-66	(-)	I	S	R	S	S	N/A	S	I	R
U-157	(+)	R	R	R	R	R	S	S	N/A	R
U-166	(-)	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Keterangan :

Ps = Pus; L = Lain - lain; U = Urine; S = *Susceptible*; I = *Intermediet*; R = *Resistant*; N/A = *Not Available*

Tabel 3. Hasil PCR dengan primer 16s RNA, bla_{SHV}, bla_{TEM}, dan bla_{CTX-M}, bla_{FOX}, bla_{KPC} dan bla_{NDM-1} pada Isolat Klinis Multi-resistensi *K. pneumoniae* di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah.

Nomor Isolat	16s RNA	ESBL			AmpC (bla _{FOX})	Karbapenemase	
		bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M}		bla _{KPC}	bla _{NDM-1}
Ps-33	(+)	-	-	(+)	-	-	-
Ps-55	(+)	-	-	(+)	-	-	-
L-66	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
U-157	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
U-166	(+)	-	-	-	-	-	-
Total	(5/5)	2/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5

PEMBAHASAN

Hasil PCR terhadap 16s RNA menunjukkan adanya pita dengan panjang basa 1,5 kilo bp pada semua sampel, sehingga disimpulkan bahwa semua sampel adalah isolat klinis *K. pneumoniae*. Empat dari lima sampel positif terhadap gen ESBL dengan uji genotip, namun terdapat satu sampel *false negative* pada uji fenotip, yakni sampel nomor L-66 dengan gen bla_{SHV} dan bla_{TEM}.

False negative ini juga ditemukan pada penelitian Tofteland dkk⁷ di Norwegia pada tahun 2003, dimana gen SHV-28 pada isolat *K. pneumoniae* memiliki aktivitas hidrolisis yang lemah terhadap *cefepodoxime* (MIC<0.75mg/liter) sehingga memiliki interpretasi negatif pada uji fenotip. Selain itu, sensitivitas uji Vitek sebesar

73%, jika dibandingkan dengan sensitivitas *Disk Diffusion Test* yang mencapai 96%.^{11,12}

Profil gen ESBL yang didapat dari hasil PCR menunjukkan proporsi yang seimbang antara gen tunggal (bla_{CTX-M}) dan gen multipel (bla_{SHV} dan bla_{TEM}). Hasil yang berbeda didapatkan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fatmawati dkk⁸ di RSUP Sanglah Denpasar tahun 2013 dan Goyal dkk¹³ di India tahun 2009 yang menyatakan bahwa profil ESBL positif didominasi oleh jumlah gen multipel (*co-existence*). Perbedaan ini terjadi karena jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini sangat terbatas.

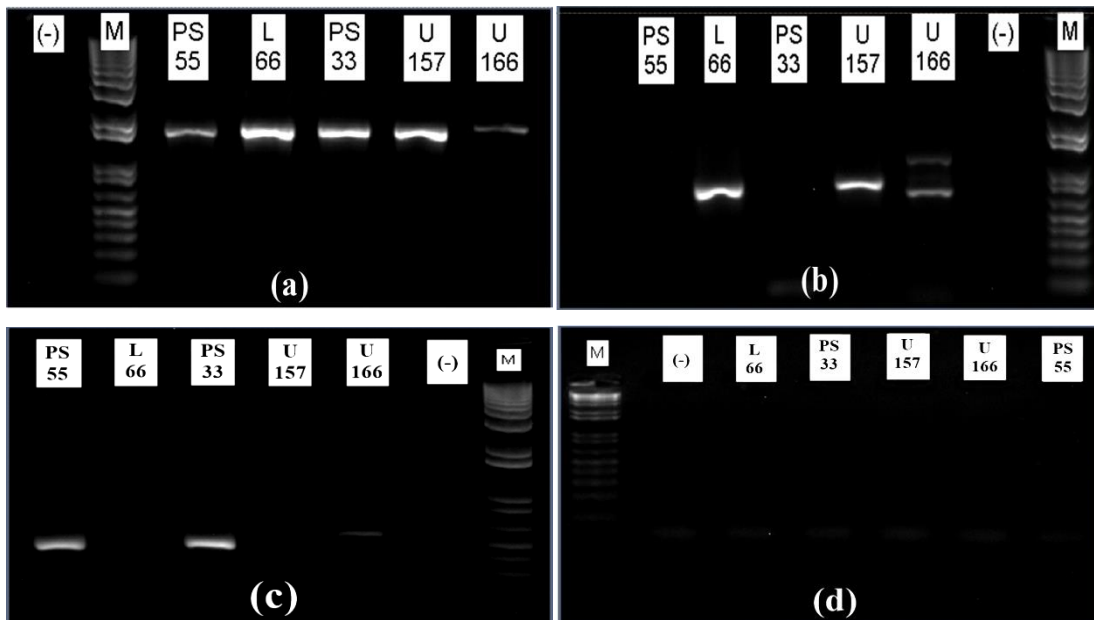
Studi yang dilakukan oleh Pitout dkk¹⁴ pada tahun 2005 menyatakan bahwa gen bla_{CTX-M} pada *E. coli* bertanggungjawab terhadap kasus

infeksi yang didapat dari komunitas, sedangkan gen bla_{SHV} dan bla_{TEM} lebih banyak ditemukan pada kasus - kasus HAIs.³ Sesuai dengan hasil studi tersebut, gen tunggal bla_{CTX-M} yang didapat dari isolat pus diidentifikasi dengan sumber penyebaran di komunitas, sedangkan gen bla_{SHV} dan bla_{TEM} yang didapat dari isolat lain - lain dan urin menyebar melalui infeksi di rumah sakit.

Secara genotip AmpC ditemukan negatif pada semua sampel meskipun secara fenotip terdapat resistensi terhadap sefalosporin generasi ketiga dan amoksisilin-asam klavulanat pada dua sampel penelitian. Penelitian yang dilakukan oleh Perez dan Hanson⁹ di

Amerika Serikat tahun 2002 menyatakan bahwa enzim AmpC dapat dikode oleh gen selain bla_{FOX} seperti bla_{ACC}, bla_{CMY}, bla_{MOX}, bla_{DHA}, bla_{CIT}, dan bla_{EBM}.

Begitu pula dengan kasus resistensi terhadap karbapenem namun tidak ditemukan adanya gen bla_{KPC} dan bla_{NDM-1} pada semua sampel penelitian. Hasil ini tidak bisa diklasifikasikan sebagai *false positif*, walaupun uji fenotip yang digunakan tidak menggunakan *Modified Hodge Test* (MHT) sesuai dengan panduan standar internasional.¹² Banyak mekanisme lain yang dapat menyebabkan resistensi terhadap karbapenemase selain adanya gen bla_{KPC} dan bla_{NDM-1}.



Gambar 1. (a) Hasil PCR 16s RNA dengan panjang basa 1,5 kilo bp; (b) Hasil PCR gen bla_{SHV} dengan panjang basa 862 bp; (c) Hasil PCR gen bla_{CTX-M} dengan panjang basa 585 bp; (d) Hasil PCR gen bla_{NDM-1} negatif pada semua sampel. Kolom M menandakan penanda (marker) dari kit PCR, sedangkan kolom (-) merupakan kontrol negatif yang digunakan.

Penelitian yang dilakukan oleh Giakkoupi dkk¹⁵ di Yunani pada tahun 2003 menyatakan bahwa kelas *Metallo-β-Lactamase* lainnya selain bla_{NDM}, yakni bla_{VIM-1} positif pada *K. pneumoniae* dengan profil resistensi terhadap karbapenem. Selain itu, penelitian di Turki oleh Poirel dkk¹⁶ tahun 2003 menemukan bahwa enzim karbapenemase pada *K. pneumoniae* juga dikode oleh gen kelas D, yaitu bla_{OXA-48}.

Adanya enzim ESBL dan AmpC ditambah modifikasi atau delesi dari protein membran luar (*Outer Membrane Protein K. pneumoniae/OmpK*) merupakan mekanisme lain resistensi terhadap karbapenem.¹⁷ Mekanisme ini banyak diteliti oleh beberapa penelitian diantaranya oleh Wozniak dkk¹⁸ tahun 2011 di Chile yang menyatakan bahwa adanya gen ESBL pada hampir 90% sampel ditambah modifikasi atau delesi dari OmpK35 merupakan mekanisme resistensi terhadap karbapenem walaupun tidak ada gen karbapenemase yang dideteksi dengan PCR.

Penelitian yang dilakukan oleh Dahmen dkk¹⁹ di Tunisia pada tahun 2008 menggunakan isolat *K. pneumoniae* Kp16137 menyimpulkan

bahwa profil resistensi terhadap karbapenem didapat akibat gen multipel (*co-existence*) bla_{TEM}, bla_{SHV}, dan bla_{CMY} ditambah delesi OmpK36.

Penelitian yang dilakukan oleh Chiu dkk²⁰ pada tahun 2012 di Taiwan juga menegaskan mekanisme utama resistensi terhadap karbapenem adalah adanya ko-eksistensi gen ESBL, AmpC, dan delesi OmpK35/36. Meskipun ditemukan adanya total prevalensi gen bla_{KPC}, bla_{NDM} dan bla_{VIM} sebesar 22,3%, namun penyebab resistensi karbapenem diakibatkan karena ko-eksistensi gen ESBL/AmpC ditambah delesi OmpK35/36 masing-masing sebesar 90% dan 95%.

SIMPULAN

Sifat resistensi antibiotik golongan β-lactam, asam klavulanat dan sefalosporin dari uji fenotip pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh adanya gen penyandi ESBL. Adapun resistensi terhadap karbapenem kemungkinan disebabkan oleh mekanisme resistensi lain, dan bukan akibat adanya gen penyandi karbapenemase.

Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui mekanisme resistensi terhadap karbapenem pada isolat klinis *K. pneumoniae* di RSUP

Sanglah, Denpasar. Penelitian yang melibatkan jumlah sampel yang lebih banyak dalam kurun waktu tertentu, mencakup gen karbapenemase di seluruh kelas (A, B, dan D), dan menganalisis profil dari protein membran OmpK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih banyak terhadap semua pihak yang membantu, terutama Laboratorium Mikrobiologi FK UNUD, Bagian/SMF Mikrobiologi FK UNUD/RSUP Sanglah, serta Instalasi Mikrobiologi Klinis RSUP Sanglah. Peneliti tidak memiliki konflik kepentingan apapun dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Center for Disease Control and Prevention (CDC). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. CDC Publisher. 2013. Tersedia pada www.cdc.gov [diakses pada 10 Desember 2014]
2. World Health Organization (WHO). *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. 2014. Tersedia pada www.who.org [diakses pada 2 Desember 2014]
3. Pitout JD dkk. *Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005;56.
4. Kanj, Souha S dan Kanafani Zeina A. *Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram - Negative Organism : Extended - Serum β - Lactamase Producing Enterobacteriaceae, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, and Multidrug - Resistant Pseudomonas Aeruginosa*. Symposium on Antimicrobial Therapy, Mayo Clinic Proceedings. 2011; 86 (3):250 - 259.
5. Nordmann, Patrice dkk. *Global Spread of Carbapenemase - producing Enterobacteriaceae*. Journal of Emerging Infectious Disease. 2011; 17:1791 - 1798.
6. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J. Bacteriol. 1991;173:697- 703.
7. Tofteland, Stale dkk. *Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended - Serum β - Lactamase Producing Clinical Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Norway*. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45(1):199-205.
8. Fatmawati, Dwi dkk. *Molecular Characterization of Extended - Spectrum β -Lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolated from clinical specimens at a tertiary-referral hospital in Denpasar, Bali, Indonesia*. Journal of Advanced Science Letters. 2014.
9. Perez FJP, Hanson ND. *Detection of Plasmid-Mediated AmpC Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR*. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40 (6):2153 - 2162.
10. Solanki, Rachana dkk. *Comparative Evaluation of Multiplex PCR and Routine Laboratory Phenotypic Methods for Detection of Carbapenemases among Gram Negative Bacilli*. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014; 8 (12):23 - 26.
11. Garrec, Helena dkk. *Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum Lactamase Production by Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiology. 2011; 49 (3):1048-1057.
12. Control and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty - Second Informational Supplement*. 2012; 32 (3). Tersedia pada www.clsi.org [diakses pada 20 Desember 2014]
13. Goyal A, dkk. *Extended - Spectrum β -Lactamase in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae & Associated Risk Factors*. Indian Journal of Medical Research. 2009; 129: 695-700.

14. Pitout JD, Laupland KB. *Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public health concern.* Lancet Infect Dis. 2008;8:159–66. doi:10.1016/S1473-3099(08)70041-0.
15. Giakkoupi P, dkk. *VIM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing Klebsiella pneumonia Strains in Greek Hospitals.* Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41 (8):3893-3896.
16. Poirel, Laurent dkk. *Carbapenamases: Molecular Diversity and Clinical Consequences.* Journal Future Microbiology. 2007; 2 (5):501-512.
17. Pages, Jean – Marie dkk. *The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria.* Journal of Nature Reviews Microbiology. 2008; 6.
18. Wozniak, Aniela dkk. *Porin alterations present in non carbapenemase producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile.* Journal of Medical Microbiology. 2012; 61:1270 – 1279.
19. Dahmen, Safia dkk. *Imipenem Resistance in Klebsiella Pneumoniae is Associated to the Combination of Plasmid – Mediated CMY-4 AmpC β -Lactamase and Loss of an Outer Membrane Porin.* Journal of Microbial Drug Resistance. 2012; 18 (5).
20. Chiu, Sheng-Kang dkk. *National Surveillance Study on Carbapenem Non – Susceptible Klebsiella pneumoniae in Taiwan : The Emergence and Rapid Dissemination of KPC – 2 Carbapenemase.* 2012. Tersedia pada www.plosone.org [diakses pada 21 Desember 2014]