

The Determining type of *Extended-Spectrum B-Lactamase Enzyme (ESBL)* from *Escherichia coli* resistance Cephalosporine of third Generation in RSUD Abdoel Moeloek Bandar Lampung

Efrida Warganegara, Ety Apriliana

Microbiology Devision, Faculty of Medicine, Unila

Abstract

In developing country such as Indonesia, infectious disease happens frequently, that caused of *Escherichia coli*. *E. coli* is normal flora in digestive system in human, but it can also cause infection in human. Nowadays, much more *Escherichia coli* found which is resistant to β -laktam antibiotic, such as cephalosporine of third generation (cefotaxim and ceftazidime). This resistance occurs because of the bacteria produces *Extended-spectrum β -lactamases (ESBL)* enzyme, with its enzyme type of TEM-1 as well as CTX-M, which is code gene is located in plasmid. In fact, bacteria that produces ESBL is always of multi drug resistant, so that it needs to be concerned. The aim this research is to determine the type the enzyme ESBL which is produced by *E. coli* clinical isolate, which is resistant to cephalosporine of third generation (cefotaxim and ceftazidime). The sample was obtained from RSUD Abdoel Moeloek in Bandar Lampung. The methodology of this research is confirmation test for existency of ESBL enzyme using doeble disc synergy test, plasmid and gene isolation, and determining the sequenc of nucleotide gene and the type of ESBL enzyme. The result of the research reveals that the type of ESBL enzyme is derivation of TEM Enzyme, TEM-1, and there is no CTX-M enzyme found. It concludes that *E. coli* clinical isolate from RSUD Abdoel Moeloek which was obtained as the type of ESBL enzyme is TEM-1. [JuKeUnila 2014;4(7):87-96]

Keyword : *E. coli*, extended-spectrum β -lactamases enzyme (ESBL), TEM-1 enzyme

Pendahuluan

Dinegara-negara sedang berkembang seperti Indonesia, penyakit infeksi masih menempati urutan pertama dari penyebab sakit di masyarakat, dan infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi tersering kedua setelah infeksi saluran nafas atas yang terjadi pada populasi, dengan rata-rata 9.3% pada wanita diatas 65 tahun dan 2.5-11% pada laki-laki diatas 65 tahun¹. Infeksi saluran kemih merupakan infeksi nosokomial tersering, yang mencapai kira-kira 40-60% dengan penyebab tersering adalah *Escherichia coli*². *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri patogen utama penyebab infeksi pada pasien rawat jalan maupun rawat inap, sekitar 85% penyebab ISK dan 50% penyebab infeksi nosokomial

di masyarakat. Infeksi ini biasanya diobati dengan antibiotika golongan sefalosporin³.

Antibiotika golongan sefalosporin, khususnya generasi ketiga (sefotaksim dan seftazidim) telah digunakan secara luas pada pengobatan berbagai penyakit infeksi, termasuk ISK karena memiliki aktifitas yang lebih kuat dan luas dari generasi sebelumnya terhadap bakteri Gram negatif, yang dapat digunakan terutama secara paerental pada infeksi serius yang resisten terhadap amoksisilin dan sefalosporin generasi pertama⁴. Adapun penyebab resistensi terhadap obat golongan β -laktam khususnya sefalosporin generasi ke-3 diatas adalah karena produksi enzim *extended-spectrum β -lactamase* disingkat *ESBL*⁵.

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) ini merupakan enzim β -laktamase

yang termutasi, menyebabkan peningkatan aktivitas enzimatis β -laktamase, sehingga enzim ini dapat menghidrolisis sefalosporin generasi ketiga dan aztreonam. Pada awalnya *ESBL* merupakan enzim β -laktamase golongan TEM, tetapi akhir-akhir ini dilaporkan timbul type baru yaitu tipe CTX-M yang frekuensinya makin meningkat. Bakteri yang memproduksi *ESBL* perlu diwaspadai karena *ESBL* diproduksi oleh gen yang berlokasi pada plasmid, yang dengan mudahnya dapat berpindah ke bakteri lain, dan seringkali juga membawa gen resisten terhadap antibiotika lain termasuk aminoglikosida, quinolon dan co-trimoxazole, sehingga sulit mencari alternatif terapi^{6,3}. Kondisi ini menyebabkan kejadian infeksi oleh bakteri penghasil *ESBL* sangat bervariasi pada satu negara ke negara lain dan dari satu kota dengan kota lain di Indonesia³.

Berdasarkan uraian pada latar belakang maka rumusan masalah yang akan diteliti adalah apakah type dari Enzim *ESBL* yang diproduksi dari gen yang berlokasi pada plasmid pada *E. coli* resisten sefalosporin generasi ke-3 (seftazidim dan sefotaksim).

Metodologi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif laboratorik, sampel adalah penderita infeksi saluran kemih yang dirawat di RSAM Bandar Lampung, lokasi penelitian di Laboratorium Rumah Sakit Abdul Moeloek, Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Lampung, Bandar Lampung, dan Laboratorium Biomolekuler Departemen Farmasi ITB, dalam kurun waktu 1 tahun mulai September 2012 - September 2013.

Isolat klinik yaitu *E. coli* yang berhasil diisolasi dari Rumah Sakit Daerah Abdul Moeloek Bandar Lampung, selama 6 bulan (Januari–Juli 2013). Untuk semua *E.*

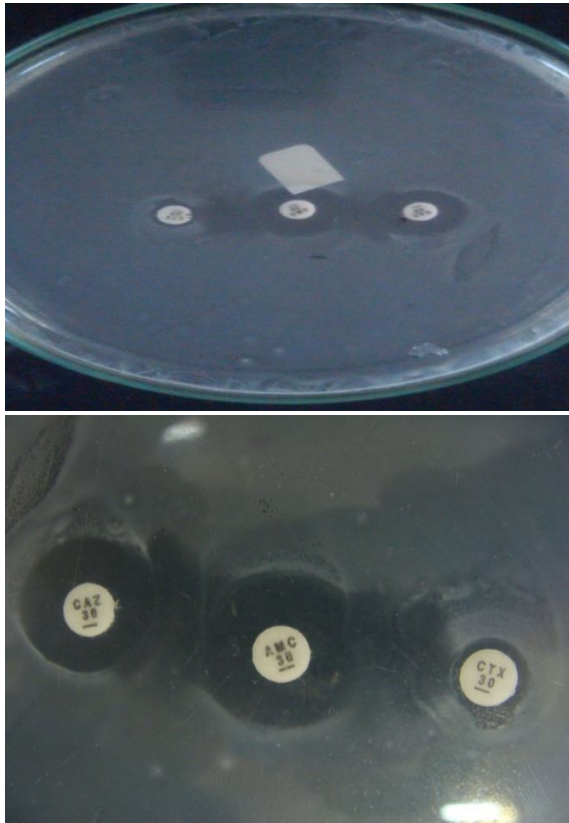
coli yang resisten dan intermediate sefalosporin generasi ketiga (ceftazidime dan cefotaxime) dilakukan uji konfirmasi dengan metoda *double disc*, menggunakan disk antibiotika ceftazidime dan cefotaksime, masing-masing dengan kadar 30 μ g, dan amoksisillin/klavulanat 20/10 μ g. Diameter hambat yang memperlihatkan pelebaran kearah amoksisillin/klavulanat 20/10 μ g, menunjukkan bahwa bakteri uji mungkin memproduksi *ESBL*. Bakteri yang uji konfirmasi DDS (+), lalu dilakukan uji keberadaan plasmid dengan cara Holmes dan Quigley, lalu dilanjutkan uji keberadaan DNA dengan amplifikasi DNA dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), menggunakan primer 1 (5'-d(ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA)-3' pada posisi -5) dan primer 2 (5'-d(GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A)-3' pada posisi 1074). Selanjutnya dilakukan penentuan urutan nukleotida dari gen untuk mengetahui tipe enzim *ESBL* dengan digunakan *terminator premix* (terminator warna A, C, G dan T), Pirofosfatase tahan panas, MgCl₂, Tris-HCl (pH 9.0), dGTP, dATP, dTTP, dCTP, AmpliTaq DNA Polimerase, templat kontrol DNA untai ganda pGEM-⁺3Zf(+) 0,2 μ g/ μ l, pprimer-21 M13 0,8 0m0l/ μ L, primer 1 dan 2 3,2 pmol, air yang dihilangkan ionnya, 25 mM EDTA pH 8.0 dengan dextran biru 50 mg/mL, formamid yang dihilangkan ionnya, mineral oil, etanol 95% dan 70%, dan 3 M natrium asetat pH 4,6.

Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Uji Konfirmasi Dengan Metoda *Double Disc Synergy (DDS)* pada *E. coli* Terhadap Keberadaan *ESBL*

Hasil uji konfirmasi menggunakan *DDS* terhadap 4 isolat *E. coli* terlihat bahwa zone lisis disekitar disk ceftazidime dan cefotaxim kearah disk amoksisillin-

klavulanat melebar, yang menandakan bahwa bakteri uji memproduksi enzim *extended spectrum β -lactamase (ESBL)* dapat dilihat pada Gambar 1.

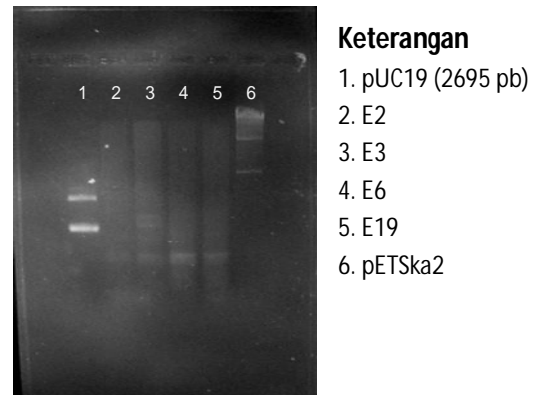


Gambar 1: *Escherichia coli* DDS (+) terhadap Sefotaksim dan Seftazidime

2. Hasil Isolasi Plasmid dari *Escherichia coli* yang Hasil Uji DDS (+)

Pada isolat *Escherichia coli* yang hasil uji DDS (+) dilakukan isolasi plasmid, dan hasilnya didapat bahwa pada 4 isolat *Escherichia coli* didapatkan plasmid yang berukuran sekitar lebih kecil dari 2700 pb, dapat dilihat pada Gambar 2.

Isolasi DNA Plasmid dari *Escherichia coli*

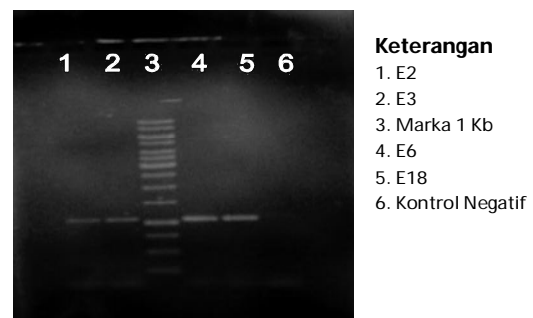


Gambar 2. Hasil isolasi plasmid dari *Escherichia coli*

3. Hasil PCR dari *Escherichia coli* yang Hasil Uji DDS (+)

Pada 4 isolat *Escherichia coli* yang hasil uji DDS (+) dan berhasil dilakukan isolasi plasmidnya, pada PCR didapatkan hasil yaitu ukuran gen ESBL sekitar lebih besar 1000 pb, sesuai dengan jumlah pasangan basa yang dibatasi oleh ke 2 primer 1 dan 2 yaitu antara 5 – 1074 pb, dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil PCR *Escherichia coli* menggunakan primer T1/T3



Gambar 3. Hasil PCR dari gen yang berlokasi pada plasmid dari *Escherichia coli*

4.c. Sampel *E. coli* (E3-T1)

4.c.1 Urutan Nucleotida Sampel *E. coli* (E3-T1)

```
TCCAATATCATGCTACTGATCAGTGTGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGAC
GTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTAT
TTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGA
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
CCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTG
CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT
GCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGA
GAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTC
TGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTC
GGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTG
CTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACG
ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCA
TGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGC
AAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
AGACTGGATGGAGGCGGATAGAGTTCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
TTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGAGT
CTCGCGGTATCTTTCGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCTCGTATC
GTAGTTATCTACACGACGGGAGTCGAGCACTATGGATGATCGAAATAGAC
AGATCACTGAGAAAGTGCCTCACTGATTAGCATTGTAAGTTGTTTCAACA
AA
```

4.c.2 Urutan Nucleotida dan Informasi Keidentikan Nukleotida Gen pada Sampel *E. coli* (E3-T1)

```
Query 611 GAGGCGGATA GAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT 670
          |||*|||
Sbjct 180 GAGGCGGATA AAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT 121
```

Dari hasil keidentikan nukleotida gennya, terdapat mutasi pada nukleotida gen A636- G dari sampel *E. coli* E3-T1

4.c.3. Urutan protein dan informasi hubungan keidentikan protein pada sampel *E. coli* (E3-T1)

```
Query 181 PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEAD R VAGPLLRSLPAGWFIADN 232
          PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEAD + VAGPLLRSLPAGWFIAD
Sbjct 181 PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEAD K VAGPLLRSLPAGWFIADK 232
```

Dari hasil keidentikan protein terdapat substitusi asam amino pada (K212-R) dari sampel *E. coli* E3-T1. Kesimpulan sampel E3-T1 mengandung derivat enzim

β -laktamase TEM-1 dengan mutasi A636-G pada gennya yang menyebabkan substitusi asam amino pada proteinnya K212-R.

4.d. Sampel *E. coli* (E6-T3)

4.d.1 Urutan Nucleotida Sampel *E. coli* (E6-T3)

```
CTAGGAGTAGCCCTTCCGACGCTGAGATACAAATTTTCGTTTCATCCATAGT
TGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA
GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGG
TCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAG
CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAG
CTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCA
AAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTG
GCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC
TGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA
AGTCATTCAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCG
TCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCAT
CATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGT
TGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCA
TCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAA
TGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACT
TCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAAGGGTTATTGTCTCAT
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACCAAATAGGGGTTTC
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATT
ATCATGACATAACCTATAAAAATAGGCTATACAGTGTCTCTTTTATA
ATAAAATAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAATAAAACA
```

4.d.2 Urutan protein dan informasi hubungan keidentikan protein pada sampel *E. coli* (E6-T3)

Dari hasil keidentikan nukleotida gen dan protein tidak terdapat mutasi sehingga tidak terdapat substitusi asam amino dari sampel *E. coli* E6-T3

Kesimpulan sampel E6-T3 mengandung derivat enzim β -laktamase TEM-1 dengan tidak dijumpainya mutasi pada gennya sehingga tidak terdapat substitusi asam amino pada proteinnya pada sampel E6-T3.

Pembahasan

Dari hasil penentuan urutan nukleotida pada keempat gen *E. coli* didapatkan bahwa semua enzim *ESBL* yang diproduksi merupakan suatu tipe enzim β -laktamase TEM-1 dan tidak ada satupun yang memproduksi enzim CTX-M. Hal ini karena *ESBL* merupakan derivat dari enzim yang berhubungan dengan enzim β -laktamase TEM atau SHV. Kedua enzim

tersebut merupakan suatu enzim induk yang memberikan sifat resisten pada ampisilin.

Mulai tahun 1980 *extended-spectrum* Sefalosporin (sefotaksim dan seftazidim) diperkenalkan untuk menahan aktifitas hidrolisis enzim induk TEM atau SHV. Namun mutan timbul yang ternyata mampu memproduksi *extended-spectrum* β -laktamase (*ESBL*) yang dapat menghidrolisis antibiotik golongan β -laktam spectrum lebar seperti misalnya *extended-spectrum* cephalosporins yang mengandung group oxyimino. *ESBL* ini dapat diinaktivasi oleh inhibitor β -laktamase seperti asam klavulanat⁷.

Penentu resistensi pengkode *ESBL* didapatkan pada elemen genetic yang mobil (plasmid) yang dapat memfasilitasi penyebaran diantara Enterobacteriaceae. *E. coli* dan *Klebsiella pneumonia* merupakan bakteri yang paling banyak membawa gen penentu resistensi *ESBL* ini. *ESBL* ini tidak hanya resisten terhadap aminopenisilin, ureidopenisilin, dan *narrow-spectrum*

cephalosporin, tetapi pada semua *extended-spectrum* cephalosporin dan aztreonam⁸.

Saat ini didapatkan lebih dari 120 *ESBL* yang berbeda-beda tipenya telah diidentifikasi, yang masing-masing tipe mempunyai profil kepekaan yang sedikit berbeda-beda, yang berakibat mempunyai dampak pada pemilihan terapi masing-masing. Yang paling penting pemilihan antibiotic untuk pengobatan dari infeksi serius karena *E. coli* yang menghasilkan *ESBL* merupakan tantangan bagi klinisi karena sifat kompleks dari test kepekaan *invitro* dan korelasinya secara *invivo*⁸.

Berkembangnya *E. coli* yang memproduksi *ESBL* dapat terjadi karena gen pengkode *ESBL* terletak pada plasmid, yang sering didapat melalui transfer informasi genetik dari 1 bakteri ke bakteri yang lain. Plasmid tersebut ternyata juga sering mengkode resistensi terhadap antimikroba yang lain, misalnya terhadap monobactam (aztreonam), aminoglikosida, fluoroquinolon, tetrasiklin, khloramfenikol, sulfonamid dan ko-trimoksazol. Sehingga resistensi multi-drug diperkirakan menjadi lebih sering pada mikroorganisme penghasil *ESBL* yang diperantarai oleh plasmid^{7,9,10}.

Prevalensi yang sesungguhnya dari *ESBL* tidak diketahui dan mungkin kita memperkirakan lebih rendah, karena kesulitan mendapatkannya dalam proses pendeteksian *ESBL* tersebut. Bagaimanapun, jelas disini bahwa bakteri penghasil *ESBL* telah terdistribusi ke seluruh dunia dan prevalensi mereka meningkat. Pada negara United States bakteri penghasil *ESBL* mulai terlihat tahun 1988 dengan prevalensi *ESBL* pada Enterobacteriaceae bervariasi antara 0-25% (rata-rata nasional 3%). Prevalensi Enterobacteriaceae bervariasi dari negara ke negara lain dan dari spesies ke spesies lain di Asia. Misalnya rata-rata resistensi *E. coli* bervariasi dari 5% di Korea sampai 23,3% di Indonesia¹¹.

Prevalensi kejadian *ESBL* di negara barat lebih rendah dibandingkan negara lain, disebabkan oleh 1) pengawasan dan penatalaksanaan terhadap kasus penyakit infeksi sudah sangat baik; 2) pembatasan dan kebijakan dalam penggunaan antibiotik golongan oxyimino-sefalosporin; 3) kebersihan diri dan lingkungan yang sudah baik; 4) isolasi pada pasien yang terinfeksi oleh bakteri penghasil *ESBL*; 5) pendidikan dan penelitian medis yang memadai untuk meminimalkan penyebaran dari bakteri penghasil enzim *ESBL*¹².

Adapun mikroorganisme yang resisten terhadap antibiotik karena memproduksi *ESBL* merupakan masalah untuk seluruh dunia, karena mempunyai resiko yang akan menyebabkan terjadinya perpanjangan pemakaian antibiotika, memperlama tinggal di ICU, memperberat penyakitnya dan penggunaan alat medis invasif¹³. Selain itu juga memberikan dilema pengobatan yang utama karena sangat terbatasnya pilihan antibiotik yang digunakan. Infeksi dengan bakteri penghasil *ESBL* biasanya didapat di rumah sakit, seperti infeksi saluran kemih, peritonitis, abses intraabdominal, dan pneumonia diperantarai ventilator⁷.

Mekanisme resistensi terhadap antibiotika β -laktam selain dipengaruhi oleh pembentukan enzim *ESBL*, dapat disebabkan oleh 1) penetrasi kurang pada bakteri; 2) pengurangan afinitas target obat dengan substitusi asam amino yang terjadi pada bakteri Gram positif dan negatif; 3) penurunan permeabilitas karena mutasi atau pengurangan dari pembentukan porin yang terdapat pada bakteri Gram negatif; 4) berkurangnya PBP terhadap obat yang spesifik; dan 5) gagalannya aktivasi enzim autolitik dalam dinding sel¹⁴.

Masalah lain yang ditimbulkan dari gen *ESBL* yang berlokasi pada plasmid adalah karena mudahnya plasmid berpindah diantara bakteri yang berbeda. Akibatnya

bakteri penghasil *ESBL* resisten terhadap banyak kelas antibiotik. Koresistensi yang paling sering ditemukan pada bakteri penghasil *ESBL* adalah terhadap aminoglikosida, fluorokuinolon, tetrasiklin, khloramfenikol, dan sulfametoksazol-trimetoprim¹³.

Munculnya bakteri penghasil *ESBL* menimbulkan tantangan dalam terapi, sehingga dibuat pedoman terbaru yang dikeluarkan oleh CLSI yang merekomendasikan untuk melaporkan semua konfirmasi isolat *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* yang menghasilkan *ESBL* sebagai bakteri yang resisten untuk semua penisilin, sefaosporin, dan aztreonam, meskipun secara *in vitro* dinyatakan sensitif terhadap beberapa obat tersebut¹⁵.

Antibiotik carbapenem secara luas diterima sebagai obat pilihan pertama dalam pengobatan kasus infeksi yang disebabkan oleh strain Enterobacteriaceae penghasil *ESBL*. Obat golongan tersebut dianggap cukup stabil dari hidrolisis enzim *ESBL*, didistribusikan secara luas ke seluruh tubuh¹³. Kelemahan obat ini pada harganya yang masih relatif mahal, penggunaan yang lebih baik secara parenteral. Karena memiliki spektrum yang luas, akan memicu kemungkinan infeksi oleh jamur dan bakteri yang resisten terhadap carbapenem¹⁶.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan dari penelitian ini adalah semua gen *ESBL* yang ditentukan urutan nukleotidan dan urutan proteinnya, didapatkan tipe enzimnya merupakan derivat dari enzim β -laktamase tipe TEM (TEM-1), dan tidak satupun yang merupakan tipe CTX-M.

Saran adalah agar melakukan skrining bagi penderita yang masuk RS dan perawat di RS untuk mengetahui ada tidaknya flora normal *E. coli* pada tubuhnya yang membawa gen pengkode *ESBL* atau tidak.

Daftar Pustaka

1. Smyth EG., O'Connell N., 2004, Complicated urinary tract infection, *Drug & Therapy Perspective*, 11 (1) : 63-6
2. Naber K G, Carson C, 2004, Role of fluoroquinolones in the treatment of serious bacterial urinary tract infections, 64 (12) : 1359-73
3. Wahyono, H, 2007, Peran Mikrobiologi Klinik pada Penanganan Penyakit Infeksi, *Pidato Pengukuhan Guru Besar Mikrobiologi*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
4. Jawetz E, Melnick J, Aldenberg E, 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Jakarta, EGC, hal. 357-359
5. Farmer III J.J., Boatwright K.D., Michael Janda J., 2007, Enterobacteriaceae : introduction and Identification, p. 649-669, In P.R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Vol. 1, ASM Press, Washington D.C.
6. Lars Bogo Jensen, Hendrik Hasman, Yvonne Agerso, Hanne-Dorthe Emborg, and Frank M. Aurestrup, 2006, First Description of an Oxyimono Cephalosporine-resistant, *ESBL* Carrying *Escherichia coli* Isolated from Meat Sold in Denmark, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, Advanced access Published, February 27.
7. Uchadhary & R. Aggarwal, 2004, Extended Spectrum β -lactamase (*ESBL*) – An Emerging Threat to Clinical Therapeutics, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22 : 75-80
8. Annie Wong-Beringer, PharmD, 2001, Therapeutic Challenges Associated with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, Pharmacotherapy Publication, WebMD Professional.

9. Michael R. Mulvey, Elizabeth Bryce, David Boyd, Marianna Ofner-Agostini, Sara Christianson, Andrew E. Simor, Shirley Paton, and The Canadian Hospital Epidemiology Committee of The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada, 2004, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, April, Bo. 48, No. 4, p. 1204-1214.
10. Asma M Al-Jasser, 2006, Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) : A Global Problem, *Kuwait Medical Journal*, September, 38 (3) : 171-185
11. Mark E. Rupp and Paul D. Fey, 2003, Extended Spectrum β -lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae, Consideration for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment, *Drug*, Leading article, Adis International Limited, All right reserved, 63 (4), 353-366.
12. Ahmed, K dkk, 2010, Extended spectrum beta-lactamase mediated resistance in *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Kashmir, India, *Afr. J. Microbiol Res* ; 5 (2): 2721-2728
13. Patterson, David L, 2006, Resistance in gram negative bacteria: Enterobacteraceae , Association for Professionalism in Infection Control and Epidemiology, Vol. 34 No. 5 Supplement 1. Smyth EG., O'Connell N., 2004, Complicated urinary tract infection, *Drug & Therapy Perspective*, 11 (1) : 63-6
14. Katzung, Bertram G, 2010, *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Edisi 10, EGC, Jakarta, hlm. 747.
15. Franklin R. Cockerill et al, 2011, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, CLSI, Twenty-first Informational Supplement, Vol. 31 No. 1, M100-S21
16. Del Mar TM, Cartelle M, Pertega S, et al, 2005, Hospital Outbreak caused by a carbapenem resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis, and risk factor for colonization and infection, *Clin Microbiol Infect*, 11:540-46