

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BIOMOLEKULER BAKTERI PENYEBAB PNEUMONIA YANG RESISTEN SEFTRIAKSON DI RSUP PROF. DR. R. D. KANDOU MANADO

Harum Maranatha Latuharhary<sup>1)</sup>, Fatimawali<sup>1)</sup>, Beivy J. Kolondam<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado

<sup>2)</sup>Program Studi Biologi FMIPA UNSRAT Manado

### ABSTRACT

*Bacteria are microorganisms that can cause disease and one example is pneumonia. The occurrence of pneumonia is caused by the entry of bacteria to the peripheral passage of the lungs through the respiratory channel resulting in inflammation. The choice of ceftriaxone as antibiotic is associated with its use in the treatment of pneumonia. This study aims to identify ceftriaxone-resistant bacteria isolated from pneumonia patient's sputum based on 16S rRNA gene sequence. Sputum samples were taken from two participants of pneumonia patients and then tested the resistance of bacteria to ceftriaxone. The result showed three resistant isolates (50%), two intermediates isolates (33%), and one sensitive isolates (17%). The bacteria isolates were then identified using 16S rRNA gene sequence. Based on the small diameter of the inhibition zone formed, one isolate was selected with the highest resistance to be identified. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) result was accessed online (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) that shows the closest similarity the nucleotide sequence of the bacterial 16S rRNA gene in the GenBank. The isolate is identical (100% similar) with *Klebsiella pneumonia* in the GenBank.*

**Keywords:** *Pneumonia, sputum, antibiotic resistant bacteria, Ceftriaxone, 16S rRNA Gene.*

### ABSTRAK

Bakteri merupakan mikroorganisme yang dapat menyebabkan penyakit dan salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri adalah pneumonia. Terjadinya penyakit pneumonia diakibatkan oleh masuknya bakteri ke paru bagian perifer melalui saluran respiratori sehingga terjadi peradangan. Pemilihan seftriakson berkaitan dengan penggunaannya dalam pengobatan pneumonia. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri resisten seftriakson yang diisolasi dari sputum penderita pneumonia berdasarkan sekuens gen 16S rRNA. Sampel sputum berasal dari 2 partisipan penderita pneumonia kemudian dilakukan uji resistensi terhadap seftriakson. Hasil uji menunjukkan 3 isolat resisten (50%), 2 intermediet (33%), dan 1 sensitif (17%). Isolat bakteri tersebut kemudian diidentifikasi berdasarkan gen 16S rRNA. Berdasarkan kecilnya diameter zona hambat yang dibentuk maka dipilih satu isolat dengan resistensi paling tinggi untuk diidentifikasi. Hasil *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* yang diakses secara online (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) menunjukkan kemiripan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat dengan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang ada di GenBank yaitu 100% kemiripan dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

**Kata Kunci:** *Pneumonia, sputum, bakteri resisten antibiotik, Seftriakson, Gen 16S rRNA.*

## PENDAHULUAN

Pneumonia merupakan masalah kesehatan di dunia karena menyebabkan angka kematian yang tinggi. Kasus pneumonia terbanyak terjadi di Asia Selatan, Amerika dan Afrika. Prevalensi kasus pneumonia di Provinsi Sulawesi Utara pada tahun 2015 adalah sebesar 2,68%. Populasi yang rentan terserang pneumonia adalah anak-anak usia di atas dua tahun, usia lanjut lebih dari 65 tahun dan orang yang memiliki masalah kesehatan seperti malnutrisi dan gangguan imunologi (KemenkesRI, 2015).

Pneumonia merupakan inflamasi pada parenkim paru (Rahajoe *et al.*, 2008). Pada inspeksi, penderita pneumonia tampak sakit, berkeringat, panas tinggi, dan menggigil (Alsagaff dan Mukty, 2010). Bakteri yang dapat menyebabkan pneumonia adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, dan *Mycoplasma pneumoniae* (Rahajoe *et al.*, 2008). Menurut Sukandar (2009), terapi pengobatan pneumonia dapat menggunakan antibiotik golongan sefalosporin misalnya seftriakson, penisilin misalnya ampisilin, dan kuinolon misalnya siprofloksasin, karena memiliki spektrum antibiotik yang luas sehingga dapat peka terhadap bakteri yang menyebabkan terjadinya pneumonia. Seftriakson adalah sefalosporin generasi ketiga dengan aktivitas spektrum luas terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif (Grau *et al.*, 2014).

Resistensi didefinisikan sebagai tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik (Tripathi, 2003). Resistensi terjadi ketika bakteri menyebabkan turun atau hilangnya efektivitas obat, senyawa kimia atau bahan

lainnya yang digunakan untuk mencegah atau mengobati infeksi (Bari *et al.*, 2008). Berdasarkan studi Karundeng *et al.* (2016), bakteri yang diketahui menyebabkan penyakit pneumonia yaitu *Erythrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus sp.* Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *Erythrobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, dan *Staphylococcus aureus* telah resisten terhadap antibiotik seftriakson.

Pemakaian antibiotik yang tidak teratur, dan dosis yang kurang tepat akan memberikan derajat resistensi yang semakin meningkat terhadap berbagai antibiotik (Scheld, 2003). Hal ini menyebabkan berbagai masalah, diantaranya meluasnya resistensi, timbulnya kejadian infeksi yang sulit diobati, meningkatkan beban ekonomi pelayanan kesehatan, efek samping yang lebih toksik dan kematian (Johnston, 2012).

Penggunaan penanda molekuler saat ini menjanjikan dalam usaha konservasi, karena penanda molekuler efektif menghasilkan informasi variasi genetik suatu spesies (Rahayu *et al.*, 2015). Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan metode berbasis molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA. Identifikasi dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA dinilai memberikan hasil yang sangat akurat dan dapat dijadikan sebagai metode diagnosis dalam aplikasi klinis. Analisis sekuensing dapat menjawab berbagai permasalahan yang berkaitan dengan identifikasi berbasis mikrobiologi konvensional, diantaranya yaitu dapat digunakan pada mikroorganisme yang tidak dapat dikultur serta menunjukkan hasil yang dapat digolongkan pada genus atau spesies tertentu (Clarridge, 2004).

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui resistensi bakteri pada sputum pasien pneumonia terhadap antibiotik. Antibiotik yang dipilih yaitu seftriakson karena berkaitan dengan penggunaannya dalam pengobatan penyakit pneumonia. Untuk identifikasi spesies bakteri tersebut, dilakukan analisis secara biomolekuler menggunakan sekuens gen 16S rRNA.

## **METODE PENELITIAN**

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian telah dilakukan pada bulan Januari - Maret 2018 di Laboratorium Mikrobiologi di Program Studi Farmasi dan di Laboratorium Bioteknologi di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

### **Jenis Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif untuk menemukan ada atau tidaknya bakteri dari sputum individu dengan penyakit Pneumonia yang resisten terhadap antibiotik seftriakson kemudian mendeskripsikannya.

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik, batang pengaduk, cawan petri, jarum ose, pinset, inkubator (*Incucell*), *laminar air flow* (*Biotek*), autoklaf (ALP), mikropipet (*Ecopipette*), *L-Glass*, mistar berskala, kertas label, plastik *wrap*, *aluminium foil*, kapas, kasa, seperangkat alat PCR (*T-Personal Biometra*) dan elektroforesis (*T-Personal Biometra*), dan kamera. Bahan

yang digunakan yaitu sampel sputum dari dua partisipan yang bersedia, aquades, NaCl, *yeast extract*, *tryptone*, *powder* agar, larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, alkohol 70%, larutan BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, cakram antibiotik seftriakson, *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid), primer BKXF (*forward*) dan BKXR (*reverse*), 2x My Taq HS PCR Mix (Bioline), ddH<sub>2</sub>O, gel *agarosa*, dan bufer TBE 1x.

### **Inokulasi Bakteri**

Sampel sputum ditambahkan NaCl 0,9% sebanyak 5 mL dan dilakukan pengenceran bertingkat. Pengenceran dilakukan sebanyak tujuh kali. Pengenceran bertingkat ini dilakukan dengan cara yaitu disediakan tujuh tabung reaksi yang berisi 9 mL NaCl 0,9%. Diambil sampel sputum sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pertama. Kemudian dari tabung reaksi yang pertama diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua dan seterusnya dilakukan sampai tabung reaksi ketujuh. Selanjutnya dipipet sebanyak 100 µL suspensi sputum untuk masing-masing pengenceran dan dituangkan ke atas media *Luria Bertani* (LB) *Agar Plate* yang sudah memadat. Selanjutnya cawan petri tersebut dibungkus dengan menggunakan plastik *wrap*. Sputum yang mengandung bakteri yang telah ditanamkan pada media *Luria Bertani* (LB) *Agar Plate* selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Vandepitte *et al.*, 2010).

### **Pemurnian Bakteri**

Pemilihan koloni dilakukan dengan mengamati kultur bakteri setiap pengenceran dari kedua sampel. Kemudian dilakukan pemilihan berdasarkan pengamatan morfologi koloni (bentuk,

warna, tepian dan elevasi). Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan mengkultur koloni bakteri yang telah dipilih dengan metode goresan (*streak method*) pada media LB agar plate yang lain. Hal ini dilakukan agar mendapatkan isolat bakteri yang murni untuk pengujian resistensi terhadap antibiotik seftriakson. Dari hasil pemurnian ini didapatkan 6 isolat bakteri yang diberi kode A, B, C, D, E dan F. Setelah dilakukan pemurnian, masing-masing dari keenam isolat bakteri tersebut kemudian diinokulasi kembali ke media LB agar miring untuk dijadikan kultur stok.

### Uji Resistensi

Uji resistensi dilakukan dengan membuat larutan *McFarland* 0,5 terlebih dahulu sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Bresson dan Borges, 2004). Kemudian bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum Öse steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc Farland* 0,5. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap bakteri uji (Davis and Stout, 1971).

Suspensi bakteri uji dipipet sebanyak 200 µL dan dituangkan ke seluruh permukaan media LB *Agar Plate*. Selanjutnya diratakan menggunakan *L-Glass* dan diamkan selama 5 menit. Tempatkan cakram Seftriakson 5 µg, pada permukaan media LB *Agar Plate*. Cakram antibiotik ditekan menggunakan pingset agar dapat menempel secara sempurna pada permukaan media agar. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Dibuat tiga kali pengulangan pada cawan petri berbeda (Kumala *et al.*, 2010).

Setelah diinkubasi, diamati zona bening yang terbentuk disekitaran cakram

antibiotik kemudian diukur diameternya dengan menggunakan mistar berskala atau dengan jangka sorong dengan satuan mm. Kemudian dibandingkan dengan standar zona hambat antibiotik menurut CLSI (*Clinical and Laboratory Standart Institute*).

### Identifikasi Bakteri Resisten Antibiotik Seftriakson Secara Biomolekuler

#### Isolasi DNA Genomik Bakteri

Isolasi DNA Genomik dari kultur bakteri dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid).

#### Amplifikasi gen 16S rRNA dengan Teknik PCR

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (Tpersonal, Biometra). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan primer BKXF dan BKXR (Beivy Kolondam, komunikasi pribadi). Cetakan yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA yaitu DNA genomik bakteri yang telah diisolasi. Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR yang telah dimodifikasi. Komposisi reagen PCR yaitu 15 µL ddH<sub>2</sub>O (air terdeionisasi), 2 µL templat DNA, 20 µL 2x MyTaq HS Red Mix (Bioline), 1,5 µL primer BKXF 10 pmol/µL dan 1,5 µL primer BKXR 10 pmol/µL. Pengaturan suhu mesin PCR dimulai dengan denaturasi awal (95°C selama 3 menit) yang kemudian dilanjutkan dengan denaturasi, penempelan primer, dan ekstensi DNA sebanyak 35 siklus (95°C selama 20 detik; 55°C selama 20 detik; dan 72°C selama 20 detik).

### Elektroforesis

Gel agarosa dibuat dengan mendidihkan 0,8 g agarosa powder dalam 100 mL TBE 1X (Kolondam, 2015). Produk hasil PCR sebanyak 10 µL dipipet ke dalam sumur-sumur gel agarosa. DNA ladder sebanyak 10 µL dipipet ke dalam sumur gel agarosa untuk menghasilkan ukuran pita DNA. Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan listrik sebanyak 130 volt selama 30 menit, kemudian hasilnya divisualisasikan melalui *UV-Transiluminator*.

### Sekuensing gen 16S rRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim hasil PCR dan primer ke First Base C.O., Malaysia. Data hasil sekuensing dibuka dan di sunting dengan menggunakan aplikasi Geneious v5.6. (Drummond *et al.*, 2012) kemudian dianalisis menggunakan metode BLAST melalui media online Gen Bank (NCBI), untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies dari bakteri yang resisten seftriakson.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Inokulasi Bakteri

Bakteri yang ditumbuhkan pada media agar akan membentuk suatu penampakan berupa koloni dan koloni bakteri ini dapat dilihat dengan mata langsung (Kusnadi, 2003). Pemilihan koloni yang tumbuh dilakukan dengan mengamati morfologi koloni berdasarkan ciri yang diamati yaitu warna, bentuk,

tepi dan elevasi koloni (Hadioetomo, 1990). Pemilihan koloni dilakukan dengan mengamati kultur bakteri setiap pengenceran dari kedua sampel. Kemudian dilakukan pemilihan berdasarkan pengamatan morfologi koloni. Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan mengkultur koloni bakteri yang telah dipilih dengan metode goresan (*streak method*) pada media LB agar plate yang lain. Dari hasil pemurnian ini didapatkan 6 isolat bakteri yang diberi kode A, B, C, D, E dan F. Setelah dilakukan pemurnian, masing-masing dari keenam isolat bakteri tersebut kemudian diinokulasi kembali ke media LB agar miring untuk dijadikan kultur stok.

### Uji Resistensi Bakteri Terhadap Seftriakson

Uji resistensi bakteri dilakukan terhadap antibiotik seftriakson dikarenakan seftriakson menjadi antibiotik pilihan pertama dalam pengobatan pneumonia di Instalasi Rawat Inap RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado. Pengujian resistensi antibiotik dilakukan sebanyak tiga kali dan analisis hasil resistensi bakteri terhadap antibiotik dilakukan dengan cara membandingkan pengukuran diameter zona hambat dari tiap cakram dengan standar zona hambat antibiotik menurut CLSI (*Clinical and Laboratory Standart Institute*) tahun 2010 yang ditunjukkan pada Tabel 2.

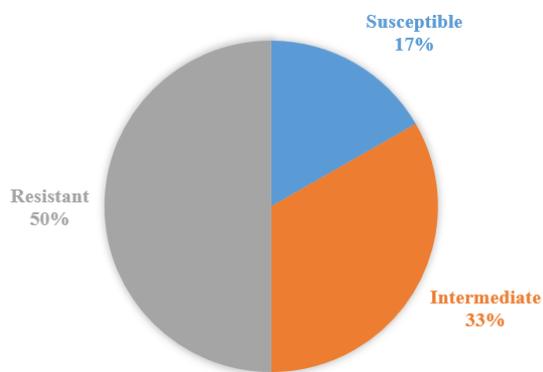
**Tabel 2. Standar Diameter Zona Hambat untuk Seftriakson (CLSI, 2010)**

| Susceptible (S) | Intermediate (I) | Resistant (R) |
|-----------------|------------------|---------------|
| 21 mm           | 14-20 mm         | ≤13 mm        |

Hasil yang diperoleh dari interpretasi dengan standar CLSI akan menunjukkan bakteri tersebut sensitif (S), intermediet (I), atau resisten (R). Hasil pengujian resistensi bakteri terhadap antibiotik ditunjukkan pada Tabel 3 dan persentase resistensi antibiotik dari bakteri ditunjukkan pada Gambar 1.

**Tabel 3. Hasil Pengujian Resistensi Antibiotik (mm)**

| Kode Bakteri | Diameter Zona Bening (mm) | Resistensi Seftriakson |
|--------------|---------------------------|------------------------|
| A            | 14                        | I                      |
| B            | 13                        | R                      |
| C            | 22                        | S                      |
| D            | 6                         | R                      |
| E            | 12                        | R                      |
| F            | 15                        | I                      |



**Gambar 1. Persentase Resistensi dari Bakteri pada Sputum Penderita Pneumonia**

Resistensi obat (antibiotik) atau drug resistance didefinisikan sebagai kemampuan suatu mikroorganisme untuk bertahan terhadap efek suatu obat yang mematikan bagi sebagian besar anggota spesiesnya (Koesoemawati, 2000). Menurut Palilingan (2015), resistensi antibiotik dapat terjadi karena beberapa

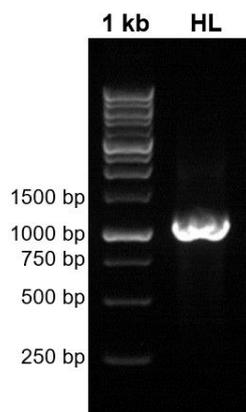
penyebab, yaitu penggunaan antibiotik yang terlalu sering atau tidak rasional, terapi antibiotik yang lama dan perawatan inap yang cukup lama sehingga dapat mempengaruhi resiko untuk terinfeksi strain bakteri resisten.

Fauna (2008) menyatakan bahwa antibiotik yang banyak digunakan pada pasien pneumonia yang menjalani rawat inap di RSK St. Vincentius A Paulo Surabaya adalah seftriakson dan telah resisten terhadap bakteri Gram negatif. Studi penelitian yang dilakukan Faisal *et al.* (2014) menyatakan bahwa seftriakson merupakan antibiotik terbanyak (31,9%) yang digunakan dalam pengobatan pneumonia di rawat inap Rumah Sakit Persahabatan Jakarta dengan resistensi sebesar 36,4% atau ke tiga tertinggi yang masuk dalam 5 besar resistensi tertinggi.

### Identifikasi Bakteri dengan Gen 16S rRNA

Isolat yang dipilih untuk dilakukan ekstraksi DNA ialah isolat D. Pemilihan isolat D diantara ketiga isolat yang resisten karena isolat D memiliki diameter zona hambat paling kecil dibandingkan ketiga isolat yang lain, sehingga dapat dikatakan isolat D memiliki resistensi paling tinggi terhadap antibiotik seftriakson.

Hasil amplifikasi yang divisualisasikan melalui *UV-Transiluminator* ditunjukkan pada Gambar 2. Pada penelitian ini yang digunakan adalah marka berukuran 1 kb dan ukuran DNA sampel yaitu sekitar 1200 bp.



**Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi DNA gen 16S rRNA dari sampel sputum penderita pneumonia**

Hasil *BLAST* menunjukkan kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat dengan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang ada pada GenBank yaitu 100% (Tabel 4).

**Tabel 4. Hasil Pencocokan Sampel di GenBank Melalui BLAST (21 Maret 2018)**

| Deskripsi Spesies (nomor akses)           | Max Identity | Author                        |
|---|--------------|-------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CP027189.1) | 100%         | Li <i>et al.</i> (2018)       |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CP027160.1) | 100%         | Benahmed <i>et al.</i> (2018) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (MG948566.1) | 100%         | Ghatak, (2018)                |

Berdasarkan hasil pencarian sekuens, sampel termasuk dalam genus *Klebsiella*. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk

batang atau basil dan masuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Hasil penelitian oleh Faisal *et al.* (2014) menunjukkan dua bakteri Gram negatif terbanyak yang didapatkan dari biakan bakteri sputum penderita pneumonia yaitu *Klebsiella pneumoniae* dan *Acinetobacter baumannii*. Studi penelitian yang dilakukan oleh Karundeng *et al.* (2016) berhasil mengisolasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari sputum penderita pneumonia dan Imaniah (2014) menyatakan bahwa *Klebsiella pneumoniae* telah mengalami resistensi terhadap antibiotik seftriakson, seftazidim, gentamisin dan trimetoprim.

**KESIMPULAN**

1. Hasil pengujian resistensi yang dilakukan menunjukkan bahwa dari 6 isolat yang di peroleh dari sputum penderita pneumonia, 3 isolat dinyatakan resisten, 2 intermediet, dan 1 sensitif dengan persentase berturut-turut yaitu 50%, 33,3%, dan 16,7%.
2. Hasil analisis gen 16S rRNA terhadap bakteri resisten paling tinggi dilihat dari hasil *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) menunjukkan kemiripan 100% dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

**SARAN**

Perlu diperhatikan penggunaan antibiotik seftriakson dalam pengobatan pneumonia terutama pada pasien pneumonia berulang (kekambuhan) dan perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui resistensi *Klebsiella pneumoniae* terhadap antibiotik lain yang digunakan dalam pengobatan pneumonia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alsagaff H., Mukty H. A. 2010. *Dasar-Dasar Ilmu Penyakit Paru*. Erlangga, Surabaya.
- Bari, S. B., Mahajan, B. M., Surana, S. J. 2008. Resistance To Antibiotic: A Challenge In Chemotherapy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*.
- Benahmed, F.H., Lutgring, J.D., Yoo, B., Machado, M., Brown, A., McAllister, G., Perry, A., Halpin, A.L., Vavikolanu, K., Ott, S., Zhao, X., Tallon, L.J., Sadzewicz, L., Aluvathingal, J., Nadendla, S., Voskania-kordi, A., Simonyan, V., Patel, J. and Shavar, R.M. 2018. FDA/CDC Antimicrobial Resistant Isolate Bank Genome Sequencing. USA
- Borges, M. T., and Bresson, W. 2004. Delivery Methods for Introducing Endophytic Bacteria into Maize. *Biocontrol*. **49**: 315-322.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17(4)**: 840-62.
- Clinical and Laboratory Standart Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 20th ed. Wayne PA, USA.
- Davis, W.W. and Stout, T.R. 1971. *Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotik Assay*. Microbiology.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., and Wilson, A. (2012). Geneious v5.6. New Zealand.
- Faisal, F., Burhan, E., Wahju Aniwidyaningsih dan Aria Kekalih. 2014. Penilaian Respons Pengobatan Empiris pada Pasien Rawat Inap dengan Pneumonia Komunitas. *J Respir Indo*. **34(2)**: 60-70.
- Ghatak, A. 2018. Characterization of laccase enzyme from bacterial strains isolated from natural sources. India
- Grau Santiago., Virginia Lozano., Amparo Valladares., Rafael Cavanillas., Yang Xie., Gonzalo Nocea. 2014. *Antibiotic expected effectiveness and cost under real life microbiology: evaluation of ertapenem and ceftriaxone in the treatment of community-acquired pneumonia elderly patients in Spain*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Hadiotomo., Ratna Siri. 1990. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. PT Gramedia, Jakarta.
- Herawati, Fauna. 2008. *Tinjauan kuantitas penggunaan antibiotik di RSK St. Vincentius A Paulo Surabaya dan rasionalitas penggunaan antibiotik pada pasien pneumonia nosokomial yang menjalani rawat inap di RSK St. Vincentius A Paulo Surabaya pada tahun 2006*. [tesis]. Universitas Surabaya.

- Johnston, L. 2012. Rational Use of Antibiotic in Respiratory Tract Infectious. *SAfrPharmJ.* **79(4)**:34-39.
- Karundeng, R. J., Fatimawali dan Widya Astuty Lolo. 2016. Identifikasi Dan Uji Sensitivitas Bakteri Yang Diisolasi Dari Sputum Penderita Pneumonia Di RSUP Prof. DR. R. D. Kandou Manado Terhadap Antibiotik Eritromisin, Seftriakson, dan Sefadoksil. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi.* **5(4)**: 259-266.
- Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2015. *Profil Kesehatan Indonesia.* Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Koesoemawati, H., Hartanto, H., Salim, I., Setiawan, L., Valleria., Suparman, W. 2000. *Kamus kedokteran Dorland. 29th ed.* EGC, Jakarta.
- Kolondam, B.J. 2015. Applying matK gene for identification of liliopsida plant species from North Sulawesi through Bold System. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* **6(2)**: 242-245.
- Kumala, S., D. A. M. Pasanema, dan Mardiasuti. 2010. Pola Resistensi Antibiotik Terhadap Isolat Bakteri Sputum Penderita Tersangka Infeksi Saluran Nafas Bawah. *Jurnal Farmasi Indonesia.* **5**: 24-32.
- Kusnadi. 2003. *Common TextBook Mikrobiologi.* JICA-IMSTEP, DGHE, dan FPMIPA UPI, Bandung.
- Li,G., Tang,Y. and Jiang,X. 2018. Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae strain KPHS1249, complete genome. *J Bacteriol.* **194(7)**: 1841-2
- Palilingan, W., Kepel, B. J. dan Fatimawali. 2015. Uji Resistensi Bakteri Pseudomonas Sp yang Diisolasi dari Plak Gigi Terhadap Merkuri dan Antibiotik Amoksisilin. *Jurnal e-Biomedik (eBm).* **3(3)**: 716-721.
- Rahajoe, N. N., Supriyatno, B., dan Setyanto, D. B. 2008. *Buku Ajar Respirologi Anak.* Badan Penerbit IDAI, Jakarta.
- Rahayu, D. A., Nugroho, E. D. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi.* Plantaxia, Yogyakarta
- Scheld, W.M. 2003. Maintaining Fluoroquinolon Class Efficacy: Review of Influencing Factors. *Emerging Infectious Disease.* **9(1)**: 1-9.
- Sukandar., Elin Yulinah. 2009. *ISO Farmakoterapi Cetak Kedua.* ISFI Penerbit, Jakarta.
- Tripathi, K. D. 2003. *Essentials of Medical Pharmacology Fifth Edition.* LN and GB Pant Hospitals, New Delhi.
- Vandepitte, J., K. Engbaek, P. Rohner, P. Piot., C.C. Heuck. 2010. *Prosedur Laboratorium Dasar Untuk Bakteriologi Klinis Edisi 2.* EGC, Jakarta.