

MUTATION RATE PADA ISOLAT *Escherichia coli* PENGHASIL EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE DARI PASIEN RAWAT INAP RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA

Rendra bramanthi*✉

Abstrak

Pada awal 1980 enzim *extended spectrum betalactamase* (ESBL) mulai ditemukan pada beberapa galur *E. coli*, salah satu karena penggunaan antibiotik spektrum luas yang kurang tepat. *Mutation rate* adalah nilai rata-rata peluang mutasi pada tiap pembelahan sel yang berhubungan dengan peluang mutasi selama bakteri tersebut hidup. Adanya *mutation rate* pada *E. coli* menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat beradaptasi dengan baik terhadap tekanan, dan hal ini menjadi masalah dalam terapi pada pasien dengan ISK. Pada penelitian ini dilakukan analisis nilai *mutation rate* dari *E. coli* penghasil ESBL sebagai penyebab infeksi saluran kemih (ISK) yang berasal dari sampel urin pasien rawat inap di RSUD Dr. Soetomo Surabaya, serta untuk mengetahui pola mutasinya. Bakteri *E. coli* penghasil ESBL dikultur pada dua puluh medium *Muller Hinton agar* (MHA) yang mengandung 100 µg rifampisin. Nilai *mutation rate* didapat dari perbandingan koloni resisten terhadap rifampisin dibagi jumlah koloni yang tumbuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 50% sampel adalah *strong hypermutable* dan sisanya sebanyak 50% adalah *weakly hypermutable*. Jadi, dapat disimpulkan bahwa bakteri *E. coli* penghasil ESBL telah bermutasi agar dapat beradaptasi pada tekanan seleksi selama proses evolusinya.

Kata kunci: *Escherichia coli* penghasil ESBL, *mutation rate*.

MUTATION RATE OF EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE PRODUCING *Escherichia coli* ISOLATES FROM PATIENTS HOSPITALIZED IN Dr. SOETOMO PUBLIC HOSPITAL SURABAYA

Abstract

In the early 1980s extended spectrum betalactamase enzymes began to be found in several strains of *E. coli*, due to the use of broad spectrum antibiotics that are less precise. Mutation rate is the average value that shows the type of mutation in a given time. The mutation rate in *E. coli* showed that these bacteria can adapt very well under stress condition, but in In this study we analyzed the mutation rate of ESBL-producing *E. coli* which comes from urine samples of hospitalized at Dr. Soetomo hospital Surabaya. The purpose of this study is to determine the mutation pattern and the frequency of mutations of ESBL-producing *E. coli* as a cause of urinary tract infection in hospitalized patients in Dr. Soetomo hospital Surabaya. In this study ESBL-producing *E. coli* was cultured on twenty Muller Hinton mediums which contain 100 µg rifampicin. The mutation rate is obtained from the comparison of rifampicin-resistant colonies divided by the number that grows. This study found there were 50% strong hypermutable and the rest of 50% were weakly hypermutable ESBL-producing *E. coli*. It shows that these ESBL-producing *E. coli* have mutated to adapt in selection pressure during their evolutionary process.

Keywords: ESBL producing *Escherichia coli*, mutation rate.

*Departemen Mikrobiologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

✉ E-mail: rendra.bramanathi@gmail.com

Pendahuluan

Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) penghasil *extended spectrum beta* (β) *lactamase* (ESBL) telah banyak diketahui sebagai ancaman baru salah satu penyebab 45% infeksi saluran kemih (ISK) Berdasarkan data Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya periode Juli–September 2012 diketahui bahwa 51 isolat urin adalah penghasil ESBL Hal ini diduga karena penggunaan antibiotik yang berlebihan.¹⁻³ Kebanyakan isolat *E. coli* rumah sakit, terutama penyebab infeksi nosokomial, telah mengalami resisten pada beberapa antibiotik atau bahkan multiresisten. Kondisi resistensi pada patogen infeksius ini tidak hanya dijumpai di rumah sakit, namun juga pada pasien rawat jalan yang disebabkan oleh enterobacteriaceae penghasil ESBL. ESBL adalah β -lactamase dengan aktivitas spektrum luas yang terbentuk dari nonESBL β -lactamase yang mengalami mutasi. ESBL adalah tipe lain dari β -lactamase, seperti TEM (*Temoneira*), SHV (*sulfhydryl variable*), CTX-M (*cefotaxime hydrolyzing capabilities*) dengan homologi sekitar 25%.⁴ Golongan enzim ini kebanyakan dikode oleh plasmid sehingga mudah untuk ditransmisikan. ESBL menghidrolisis antibiotik betalactam yang menyebabkannya resisten terhadap penicillin, cephalosporin dan aztreonam.⁵

β -lactamase, terutama yang dihasilkan oleh golongan bakteri Gram negatif, adalah contoh evolusi mekanisme resistensi pada bakteri. Berdasarkan sekuen protein diketahui bahwa bakteri penghasil β -lactamase terbagi menjadi beberapa tipe yaitu A, B, C, dan D, serta tipe yang berkaitan dengan *penicillin-binding protein*.⁶⁻⁸

Agen antibakteri atau antibiotik diketahui dapat mempengaruhi mikroflora, yang tergantung pada dosis obat, rute pemberian, dan sifat farmakokinetik/dinamik agen tersebut.⁹ Namun, penggunaan antibiotik dalam jangka panjang telah

menyebabkan resistensi pada beberapa bakteri.¹⁰

Munculnya resistensi pada bakteri adalah proses yang alami yang memungkinkan bakteri bermutasi agar bisa menjadi resisten dan mampu hidup selama penggunaan antibiotik. Keadaan ini disebut juga tekanan seleksi yaitu bakteri yang sensitif akan mati, sedangkan bakteri yang bermutasi akan mampu hidup dan membelah diri. Proses mutasi yang terjadi biasanya diikuti oleh perubahan struktur biologi bakteri.^{11,12}

Mutation rate adalah estimasi peluang mutasi pada tiap pembelahan sel yang berhubungan dengan peluang mutasi selama bakteri tersebut hidup.¹³ Beberapa bakteri mutator, yaitu bakteri yang memiliki *mutation rate* tinggi ditemukan pada isolat bakteri patogen.^{14,15} Beberapa contohnya yaitu, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori* dan *Pseudomonas aeruginosa*, dan diketahui sebanyak 1% hingga 36% isolat klinik adalah mutator.^{16,17}

Bakteri penghasil ESBL umumnya resisten terhadap antibiotik cephalosporin generasi ketiga, seperti cefotaxim, cefriaxon, dan ceftazidim. Serta mengalami resisten silang terhadap ciprofloxacin. Data terbaru RS. Dr. Soetomo Surabaya menyebutkan bahwa hanya beberapa antibiotik yang efektif terhadap bakteri penghasil ESBL.³

Pada penelitian ini akan ditentukan *mutation rate* bakteri *E. coli* penghasil ESBL yang diisolasi dari sampel urin pasien ISK di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya.

Bahan dan Metode

Penelitian ini bersifat observasional deskriptif dengan rancangan *cross sectional*. Lokasi penelitian berada di Instalasi / SMF Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya. Sampel penelitian berupa bakteri *E. coli* penghasil ESBL sebanyak 24 sampel yang berasal dari spesimen urin pasien rawat

inap Rumah Sakit Dr. Soetomo periode Januari hingga Maret tahun 2013. Penelitian ini telah mendapat pernyataan laik etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan RSUD. Dr. Soetomo dengan nomor surat 93/Panke.KKE/IV/2013.

Isolat Bakteri E. Coli

Isolat bakteri *E. coli* didapat dari spesimen urin yang dikirim ke Instalasi Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya yang telah diuji kepekaan menggunakan metode *Kirby-Bauer disk diffusion*. Hasil kultur menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan ESBL sesuai dengan *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012*.

Penentuan Mutation Rate Menggunakan Metode Luria Delbrück

Mutation rate pada bakteri *E. coli* ditentukan melalui beberapa tahap. Pertama, dilakukan peremajaan isolat *E. coli* yang sebelumnya disimpan pada suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pada media *blood agar*. Bakteri diinkubasi semalam pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Keesokan harinya dilakukan subkultur dari koloni yang tumbuh pada media cair *nutrient broth* sebanyak *McFarland* 0,5 dan diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 18-20 jam. Selanjutnya dilakukan dilusi terhadap hasil kultur pada media cair *nutrient broth* sampai tercapai kepadatan bakteri 2×10^4 CFU per ml. Kemudian diambil sebanyak 50 μl dari suspensi bakteri tersebut untuk dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 2 ml media *nutrient broth* sebanyak 40 tabung. Lalu, sebanyak 1,5 ml suspensi bakteri diambil dan disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Lalu pada pelet ditambahkan 200 μl NaCl 0,85%. Pelet kemudian diinokulasikan pada media agar darah yang telah diberi rifampicin 100 $\mu\text{g/ml}$ pada masing-masing *plate*, kemudian diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Keesokan harinya diamati ada tidaknya pertumbuhan

bakteri. Kemudian dihitung koloni yang tumbuh. Perhitungan nilai *mutation rate* menggunakan rumus Luria Delbrück:

$$\mu = - (1/N) \ln P_0$$

Keterangan:

μ = *Mutation rate*

N = Jumlah sel bakteri yang tumbuh pada media kultur.

P_0 = proporsi kultur tanpa bakteri mutan

Uji Kepekaan Difusi Cakram Terhadap Meropenem dengan Metode Kirby Bauer

Uji kepekaan difusi cakram terhadap meropenem dilakukan dengan cara metode Kirby Bauer. Cakram yang berisi antibiotik diletakkan pada media agar yang telah ditanam bakteri yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri oleh agen antibiotik pada permukaan media agar.¹⁸ Zona hambat >23 mm dinilai sebagai *susceptible*, zona hambat 22 mm dinilai sebagai *intermediate*, dan zona hambat <19 mm dinilai sebagai *resistant*

Jumlah Pengulangan Kultur

Hal yang juga penting untuk diperhatikan adalah jumlah kultur untuk masing-masing sampel yang dilakukan secara bersamaan atau paralel. Semakin banyak jumlah kultur yang dilakukan maka nilai ketepatan juga akan meningkat. Pada umumnya jumlah pengulangan yang diperlukan sebanyak 20 kultur.

Ukuran Inokulum

Parameter yang juga penting yaitu ukuran inokulum (N_0). Pada inokulum yang digunakan seharusnya tidak terdapat bakteri mutan dan harus dalam jumlah kecil. Pada percobaan yang dilakukan oleh Luria dan Delbruck, bakteri yang digunakan adalah 50 sampai 500 bakteri. Semakin kecil jumlah

inokulum bakteri, maka semakin lama waktu yang diperlukan.

Penghitungan Jumlah Bakteri

Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media agar dihitung dengan cara berikut. Bakteri disiapkan pada 2 ml media cair. Kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam satu tabung. Diambil sebanyak 1 ml, untuk disimpan pada suhu -80 °C. Dari suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 10 µl dan ditambahkan 990 µl NaCl (10^2) sehingga didapatkan pengenceran 100x. Pengenceran selanjutnya yaitu mengambil 10 µl suspensi bakteri dari pengenceran pertama (10^2) dan ditambahkan 990 µl NaCl (10^4). Lalu mengambil 100 µl suspensi bakteri pengenceran 10^4 dan ditambahkan 900 µl NaCl (10^5). Lalu diambil 100 µl suspensi bakteri pengenceran 10^4 dan ditambahkan 900 µl NaCl (10^6). Diambil 100 µl suspensi bakteri pengenceran 10^4 dan ditambahkan 900 µl NaCl (10^7). Kemudian diambil 100 µl suspensi bakteri dari dari tiap-tiap pengenceran $10^4 - 10^7$ dan diinokulasikan pada MHA, media diinkubasi pada suhu 37 °C. Perhitungan koloni (Cfu/ml) menggunakan colony count/plate x $10 \times p$. Jumlah sel dalam plate = $1,5 \times \text{Cfu/ml}$.

Pengolahan data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan SPSS 20.0, diolah secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.

Hasil

Pada penelitian ini bakteri *E. coli* penghasil ESBL ditumbuhkan pada media Mueller Hinton yang mengandung rifampisin dan tanpa rifampisin. Kultur bakteri pada media yang mengandung rifampisin didapatkan: 1. plate yang tidak ada pertumbuhan bakteri, 2. Ada plate dengan sebagian bakteri yang tumbuh dan tidak tumbuh dan, 3. Ada pertumbuhan bakteri pada seluruh plate. Lalu ditentukan nilai *mutation rate* dari bakteri tersebut. Nilai *mutation rate E. coli* penghasil ESBL dari spesimen urin pasien rawat inap Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya ditampilkan pada Tabel 1.

Dari keseluruhan sampel pada penelitian ini didapatkan bakteri *E. coli* penghasil ESBL masuk dalam kategori *strongly hypermutable* pada 12 sampel dengan nilai frekuensi mutasi $\geq 4 \times 10^{-7}$ (Tabel 3). Sementara sisanya sebanyak 12 sampel *E. coli* penghasil ESBL masuk dalam kategori *weakly hypermutable* dengan nilai frekuensi mutasi $4 \times 10^{-8} \leq f < 4 \times 10^{-7}$ yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 1. Nilai *mutation rate* *E. coli* penghasil ESBL.

No	ID Sampel	Plate Tanpa Koloni Mutasi	N : 1.5 x cfu/ml	Nilai <i>Mutation Rate</i>
1	24088	0	251,250	210×10^{-7}
2	44806	0	262,500	210×10^{-7}
3	24276	0	28,593,750	1.8×10^{-7}
4	24508	0	420,000	126×10^{-7}
5	4379	20	270,000	3.9×10^{-7}
6	6436	20	360,000	1.4×10^{-7}
7	4187	20	326,250	1.5×10^{-7}
8	4539	20	12,843,750	3.9×10^{-7}
9	24547	20	10,312,500	4.9×10^{-7}
10	24254	19	408,000	1.2×10^{-7}
11	4278	10	420,000	16×10^{-7}
12	23727	18	210,000	4.7×10^{-7}
13	24313	2	191,250	120×10^{-7}
14	4380	12	363,750	14×10^{-7}
15	4913	1	487,500	61×10^{-7}
16	4866	18	195,000	5.1×10^{-7}
17	4274	3	262,000	72×10^{-7}
18	24289	18	378,750	2.6×10^{-7}
19	4185	19	251,250	1.9×10^{-7}
20	4297	12	168,000	30×10^{-7}
21	4470	18	4,968,750	2.1×10^{-7}
22	4305	5	5,718,750	1.9×10^{-7}
23	25046	10	33,281,250	2.0×10^{-7}
24	24656	4	13,406,250	1.2×10^{-7}

Tabel 2. Kategori *mutation rate* pada *E. coli*.¹⁹

Tipe Mutator	Frekuensi Mutasi
<i>Hypomutable</i>	$f \leq 8 \times 10^{-9}$
<i>Normomutable</i>	$8 \times 10^{-9} < f < 4 \times 10^{-8}$
<i>Weakly hypermutable</i>	$4 \times 10^{-8} \leq f < 4 \times 10^{-7}$
<i>Strongly hypermutable</i>	$f \geq 4 \times 10^{-7}$

Tabel 3. *E. coli* penghasil ESBL kategori *strongly hypermutable*.

No	ID sampel	Nilai <i>Mutation rate</i>
1	4278	16×10^{-7}
2	23727	4.7×10^{-7}
3	24313	120×10^{-7}
4	4380	14×10^{-7}
5	24088	210×10^{-7}
6	4913	61×10^{-7}
7	4866	5.1×10^{-7}
8	4274	72×10^{-7}
9	44806	201×10^{-7}
10	4297	30×10^{-7}
11	24547	4.9×10^{-7}
12	24508	126×10^{-7}

Tabel 4. *E. coli* penghasil ESBL kategori *weakly hypermutable*.

No	ID sampel	Nilai <i>Mutation rate</i>
1	4278	$1,2 \times 10^{-7}$
2	23727	$3,9 \times 10^{-7}$
3	24313	$2,6 \times 10^{-7}$
4	4380	$1,9 \times 10^{-7}$
5	24088	$1,4 \times 10^{-7}$
6	4913	$1,5 \times 10^{-7}$
7	4866	$2,1 \times 10^{-7}$
8	4274	$3,9 \times 10^{-7}$
9	44806	$1,9 \times 10^{-7}$
10	24289	$1,8 \times 10^{-7}$
11	24547	$2,0 \times 10^{-7}$
12	24508	$1,2 \times 10^{-7}$

PEMBAHASAN

Adanya permasalahan kondisi resistensi di dunia medis dan lingkungan menyebabkan peningkatan patogen penghasil ESBL. Di Amerika Selatan, diketahui prevalensi *Klebsiella pneumonia* penghasil ESBL mencapai 55% dan *E. coli* sebesar 10%.²⁰ Sementara di Asia Tenggara (Malaysia, Filipina, Singapura, Thailand, dan Vietnam) *E. coli* penghasil ESBL isolat ISK paling tinggi ditemukan di Vietnam. Sejak 2010-2011 diketahui ada peningkatan secara umum di kawasan tersebut, dan pada tahun 2011-2013 diketahui sekitar 40%.²¹

Insiden peningkatan ESBL ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain durasi tinggal di Rumah Sakit, durasi perawatan di ICU, penyakit primer yang parah, intubasi, katerisasi pada saluran kemih atau vaskuler, serta penggunaan antibiotik berulang khususnya cephalosporin generasi ketiga dan keempat. ESBL juga menjadi masalah pada pasien rawat jalan yang sering mendapatkan resep quinolone dan cephalosporin generasi ketiga.⁵

Pada penelitian ini *mutation rate* ditentukan menggunakan metode Luria-Delbrück, diketahui distribusi *mutation rate*

resisten rifampicin pada *E. coli* penghasil ESBL yang diisolasi dari urin pasien penderita ISK adalah 50% bertipe *strongly hypermutable* ($f \geq 4 \times 10^{-7}$) (Tabel 3) dan 50% sisanya adalah *weakly hypermutable* ($4 \times 10^{-8} \leq f < 4 \times 10^{-7}$) (Tabel 4). Penemuan ini menunjukkan bahwa *mutation rate* pada *E. coli* penghasil ESBL telah mengalami peningkatan. Sejalan dengan penelitian sebelumnya yang mendapatkan sebanyak 56% isolat penghasil ESBL yang berasal dari infeksi saluran kemih.¹ Strain bakteri *E. coli* uropatogenik menunjukkan *mutation rate* yang tinggi jika dibandingkan dengan bakteri komensal lainnya.^{19,22,23} Bukti lain menunjukkan *E. coli* penghasil ESBL yang diisolasi dari urin telah mengalami peningkatan *mutation rate* sebanyak 40%, sedangkan isolat mutator ESBL negatif hanya sebesar 26%.¹

Penelitian ini menunjukkan bahwa telah terjadi mutasi pada bakteri *E. coli* penghasil ESBL yang diisolasi dari urin. Mutasi ini terjadi secara bertahap pada gen *ancestor* yang mengkode ESBL (seperti TEM-1, atau SHV-1, serta *ancestor* TEM-4 dan SHV-12) pada strain *hypermutable* yang membawa plasmid tersebut kemudian diikuti transfer plasmid ke strain *nonhypermutable*. Transfer plasmid secara horizontal antar strain rumah

sakit semakin meningkatkan *hypermutator* penghasil ESBL. Hal ini karena strain *hypermutable* lebih resisten terhadap antibiotik.²⁴ Penelitian lain juga menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan *mutation rate* dengan resistensi terhadap antibiotik, yaitu sebanyak 3 kali pada *E. coli* ($p = 0,0001$), 1,8 kali pada enterococci ($p = 0,016$), dan 1,5 kali pada CoNS ($p = 0,012$). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan antibiotik dan seleksi yang terkait dengan resistensi antibiotik menyebabkan mutator semakin banyak. Selain faktor tersebut disebutkan bahwa respons imun inang dan kerusakan jaringan karena patogenesis juga meningkatkan jumlah mutator.^{25, 26, 27}

Fenomena ini menunjukkan bahwa isolat *E. coli* penghasil ESBL di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya telah meningkatkan kemampuan adaptasinya terhadap paparan antibiotik jenis baru atau untuk mendapatkan fitur-fitur baru dalam kaitannya dengan kemampuan virulensi dan epidemik.²⁸

Kesimpulan

Pada penelitian ini diketahui *mutation rate* resisten rifampicin pada *E. coli* penghasil ESBL isolat urin pasien penderita ISK di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya adalah 50% bertipe *strongly hypermutable* dan 50% adalah *weakly hypermutable*.

Daftar Pustaka

1. Baquero MR, Galan JC, Turrientes MDC, Canton R, Coque TM, Martinez JS, Baquero F. Increased Mutation Frequencies in *Escherichia Coli* Isolates Harboring Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 2005; 49(11):4754-4756.
2. Andersson DI and Levin BR. The Biological Cost of Antibiotic Resistance. *Current Opinion in Microbiology*. 1999. (2):289-493.
3. Kuntaman K, Lestari ES, Severin JA, Kershof IM, Mertaniasih NM, Purwanta M, Hadi U, Johnson JR, Belkum A VV, Hendi A. Fluoroquinolone – Resistant *Escherichia coli* Indonesia. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11(9):1363-1369.
4. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-Lactamases: A Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(4):657–686.
5. Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, Melkes A, Posch J, Winter I, Zarfel G, Marth E. ESBL Producing *E. coli* in Austrian Sewage Sludge. *J Waters*. 2009; 11:052.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme For β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:1211–1233.
7. Massova I, Mobashery S. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1–17.
8. Bonnet R, Sampaio JI, Chanal C et al. A Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase (Bes-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:3061–3068.
9. Sullivan A, Edlund C, and Nord CE. Effect of Antimicrobial Agents on The Ecological Balance of Human Microflora. *Lancet Infectious Diseases*. 2001; 1: 101–14.
10. Sjölund M, Wreiber K, Andersson DI et al. Long-Term Persistence of Resistant Enterococcus Species After Antibiotic Treatment to Eliminate *Helicobacter pylori*. *Annals of Internal Medicine*. 2003.
11. Martinez JL and Baquero F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 2000; 4(4):1209-1214.
12. Tenailon O, Denamur E, and Matic I. Evolutionary Significance of Stress Induced Mutagenesis in Bacteria.

- Elsevier Trends In Microbiology*. 2004; 12:264-270.
13. Luria S and M Delbrück. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*. 1943; 28:491–511.
 14. Matic I, Radman M, Taddei F et al. Highly Variable Mutation Rates in Commensal and Pathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 1997; 277:1833–4.
 15. Giraud A, Radman M, Matic I et al. The Rise and Fall of Mutator Bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2001; 4: 582–5.
 16. Leclerc JE, Li B, Payne WL et al. High Mutation Frequencies Among *Escherichia coli* and Salmonella Pathogens. *Science*. 1996; 274:1208–11.
 17. Oliver A, Canton R, Campo P et al. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science*. 2000. 288:1251–4.
 18. Pratiwi St. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga. 2008.
 19. Baquero MR, Al Nilsson, MC Turrientes, D Sandvang, JC Gala´N, JL Marti´Nez, N Frimodt-Moller, F Baquero, and DI Andersson. Polymorphic Mutation Frequencies in *Escherichia coli*: Emergence of Weak Mutators in Clinical Isolates. *J Bacteriol*. 2004; 186:5538–5542.
 20. Gales AC, Sader HS, Jones RN, Sentry Participants Group (Latin America). Urinary Tract Infection Trends in Latin American Hospitals: Report from The Sentry Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44(3):289–299.
 21. Lob S, M Hackel, D Biedenbach, D Sahn, R. Badal, Trends in ESBL-Production and Susceptibility for *E. coli* from Urinary Tract Infections In Southeast Asia: Smart 2010-2013. USA: A Johnson, D Hoban International Health Management Associates, Inc.
 22. Denamur ES, Bonacorsi A, Giraud P, Duriez F, Hilali C, Amorin E, Bingen A, Andremont B, Picard F, Taddei and I Matic. High Frequency of Mutator Strains Among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *J Bacteriol*. 2002; 184:605–609.
 23. Miller K, AJ O’neill, and I Chopra. *Escherichia coli* Mutator Present an Enhanced Risk for Emergence of Antibiotic Resistance During Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:23–29.
 24. Oliver A, R Canto´N, P Campo, F Baquero, and J Bla´Zquez. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science*. 2000; 288:1251–1254.
 25. Gustafsson I, Sjölund M, Torell E, Johannesson M, Engstrand L, Cars O, and Dan IA. Bacteria with Increased Mutation Frequency and Antibiotic Resistance are Enriched in The Commensal Flora of Patients with High Antibiotic Usage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52:645–650. doi: 10.1093/Jac/Dkg427
 26. Mao EF, Lane L, Lee J. et al. Proliferation of Mutators in A Cell Population. *Journal of Bacteriology*. 1997; 179:417–22.
 27. Giraud A, Matic I, Radman M. et al. Mutator Bacteria as A Risk Factor in Treatment of Infectious Diseases. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2002; 46:863–5.
 28. Marti´Nez JL, and F Baquero. Interactions Among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:647–679.