

Deteksi Gen *mecA* pada *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus* dengan Metode *Loop Mediated Isothermal Amplification*

Tri Umiana Soleha¹, Oktafany²

¹ Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

² Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) saat ini telah dikenal sebagai bakteri patogen rumah sakit hampir di seluruh dunia. Untuk skrining MRSA dibutuhkan metode yang cepat, tepat, dan dapat dipercaya. Teknik molekuler dapat dilakukan dengan mendeteksi MRSA pada *Staphylococcus aureus* menggunakan polymerase chain reaction (PCR) untuk mengetahui adanya gen *mecA* dengan teknik amplifikasi DNA. Tetapi saat ini telah ditemukan suatu teknik amplifikasi DNA yang lebih mudah dan murah dari PCR yaitu loop mediated isothermal amplification (LAMP). Sebanyak 129 sampel dari pasien pascaoperasi yang mengalami infeksi diidentifikasi dan didapatkan hasil 41 sampel merupakan *Staphylococcus aureus*. Kemudian dari 41 *Staphylococcus aureus* yang diisolasi, dilakukan pemeriksaan gen *mecA* untuk skrining adanya MRSA menggunakan metode LAMP. Dari 41 isolat *Staphylococcus aureus* didapatkan hasil sebanyak 7,3% terdeteksi adanya gen *mecA* dengan metode LAMP sedangkan sisanya sebesar 92,7% hasilnya negatif yang berarti tidak memiliki gen *mecA*.

Kata kunci: gen *mecA*, LAMP, MRSA

Pendahuluan

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) saat ini telah dikenal sebagai bakteri patogen rumah sakit hampir di seluruh dunia. MRSA pertama kali diidentifikasi pada tahun 1960 sebagai bakteri patogen pada infeksi nosokomial.^{1,2}

MRSA adalah galur *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap semua antibiotik golongan betalaktam seperti penisilin, metisilin, dan sefalosporin. Metisilin merupakan antibiotik dengan spektrum sempit dari kelompok penisilin. Metisilin berperan dalam menghambat pembentukan dinding sel bakteri Gram positif melalui hambatan terhadap cross-linkage polimer peptidoglikan. Mekanisme ini terjadi melalui ikatan antara metisilin dengan enzim transpeptidase atau penicillin binding protein (PBP). Tetapi mekanisme ini tidak berlaku pada MRSA, dimana hampir semua MRSA menghasilkan PBP2a yaitu suatu protein yang dikode oleh gen *mecA* yang berperan

pada resistensi terhadap golongan betalaktam. Gen *mecA* adalah gen pengkode resistensi terhadap metisilin yang ditemukan pada *Staphylococcus aureus*. Gen resisten ini mengkode penicillin binding protein 2a (PBP2a) yang tidak mengikat metisilin sebagaimana penicillin binding protein yang normal.^{1,3,4}

Angka kejadian MRSA di beberapa negara bervariasi, tergantung kebijakan pada masing-masing negara dalam mengontrol infeksi nosokomial. MRSA terus meningkat di berbagai belahan dunia. Di Asia, prevalensi infeksi MRSA pada tahun 2011 kini mencapai 70%.^{5,6,7,8,9}

Identifikasi secara molekuler dapat dilakukan dengan cara deteksi gen *mecA* yang merupakan pengkode PBP2a pada MRSA menggunakan polymerase chain reaction (PCR).² Tetapi saat ini telah ditemukan suatu cara identifikasi DNA dengan teknik amplifikasi yang lebih mudah dan murah dari

PCR yaitu *loop mediated isothermal amplification* (LAMP).^{11,12,13,14,15,16}

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang memiliki struktur dan organisasi dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan bakteri Gram negatif. Secara mikroskopis bakteri ini terlihat berbentuk bulat/kokus dengan diameter 1µm, biasanya tersusun dalam kelompok-kelompok tak beraturan seperti buah anggur. Bakteri ini mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan baik dalam suasana aerobik atau mikroaerofilik.^{17,18,22}

Antibiotik golongan betalaktam merupakan obat pilihan utama untuk melawan aktivitas *Staphylococcus aureus*. Semua obat betalaktam merupakan penghambat selektif terhadap sintesis dinding sel bakteri, sehingga secara aktif menghambat pertumbuhan bakteri. Salah satu penghambatannya melalui pengikatan obat pada reseptor sel protein pengikat penisilin atau penicillin binding protein (PBP). Setelah obat melekat pada satu reseptor PBP atau lebih, reaksi transpeptidase dihambat dan sintesis peptidoglikan terhambat. Langkah selanjutnya kemungkinan melibatkan adanya inaktivasi suatu enzim penghambat autolisis pada dinding sel, sehingga mengakibatkan aktifnya enzim autolisis dan terjadi lisis sel.^{17,19,20,21}

Resistensi MRSA dibawa oleh gen *mecA*, yang mengkode perubahan pada penicillin-binding protein (PBP2a), sehingga mengakibatkan penurunan afinitas ikatan terhadap betalaktam (penisilin, sefalosporin, dan karbapenem). Proses ini biasanya diatur oleh kromosom.^{23,24,25} Gen *mecA* yang membawa sifat resistensi terhadap metisilin terletak di dalam kromosom. Untuk mengatasi resistensi ini dapat digunakan antibiotik golongan glikopeptida yaitu vankomisin. (3) Kegagalan aktivasi enzim autolitik pada dinding sel, yang dapat menyebabkan inhibisi tanpa membunuh

bakteri, misalnya toleransi beberapa *Staphylococcus*. (4) Kegagalan mensintesis peptidoglikan, misalnya pada bakteri berbentuk L dengan dinding sel bakteri yang rapuh atau bakteri yang secara metabolik tidak aktif.^{26,27}

Seperti yang telah dikemukakan di atas, mekanisme resistensi MRSA terhadap antibiotik dikendalikan oleh gen *mecA* yang berada di dalam kromosom bakteri. Gen ini menyebabkan terjadinya perubahan pada *penicillin binding protein* (PBP2a), sehingga menyebabkan perubahan jumlah PBP dan mengakibatkan penurunan afinitas ikatan terhadap antibiotik betalaktam.^{28,29,30}

Insiden MRSA dari tahun ke tahun terus meningkat. Sejak ditemukan epidemi MRSA pertama kali di Amerika Serikat tahun 1968 hingga kini, MRSA masih menjadi masalah utama infeksi nosokomial. MRSA termasuk dalam *emerging infectious pathogen*.^{31,32,33}

Di Jepang kurang lebih 10 tahun telah dikembangkan metode amplifikasi DNA pada kondisi isothermal yaitu *loop mediated isothermal amplification* (LAMP). Dari beberapa penelitian tentang LAMP ini disimpulkan bahwa metode ini sangat spesifik dan mempunyai sensitivitas yang tinggi, cepat dan ekonomis. LAMP memiliki selektivitas yang tinggi karena mengenali target 6 urutan yang berbeda pada awal reaksi.¹⁵

Metode LAMP juga berpotensi untuk memfasilitasi tes genetik pada berbagai penyakit infeksi. Berikut dijelaskan beberapa karakteristik dari metode LAMP:^{17,33,34,35}

1. Pada metode LAMP, semua pereaksi dapat dilakukan pada suhu isothermal (60⁰–65⁰C) dengan hanya menggunakan satu macam enzim.
2. Spesifisitas reaksi ini sangat tinggi karena menggunakan 4 jenis primer yang berbeda yang mengenali 6 urutan yang

berbeda pada DNA target. Spesifisitas metode LAMP dapat ditingkatkan dengan menambahkan dua atau lebih primer ke dalam reaksi.

3. Amplifikasi dapat dilakukan dalam waktu yang lebih singkat dari PCR.
4. Metode LAMP menghasilkan DNA teramplifikasi dalam jumlah yang sangat besar sehingga deteksi dapat dilakukan secara visual berdasarkan kekeruhan atau fluoresensi dari pereaksi yang dicampur ke dalam tabung reaksi.

Metode LAMP ini menggunakan sebuah polimerase DNA dan empat primer yang didesain untuk mengenal enam sekuens DNA target. Sintesa DNA dengan pemindahan untai dimulai oleh primer bagian dalam dan luar yang dihibridisasi kepada ujung akhir dari target yang menghasilkan struktur DNA stemloop. Selanjutnya siklus LAMP primer bagian dalam dihibridisasi ke dalam loop dan memulai pemindahan sintesis DNA, yang menunjukkan DNA stemloop orisinil dari sebuah DNA stemloop baru dengan batang dua kali lipat lebih panjang. Reaksi perputaran berlanjut dengan akumulasi 10^9 kopi dari target DNA dalam waktu kurang dari satu jam.^{34,35}

Pada langkah awal dari reaksi LAMP, keempat primer digunakan, namun pada fase berikutnya hanya primer bagian dalam yang digunakan yaitu forward inner primer (FIP) dan backward inner primer (BIP). Dua primer bagian luar yaitu F3 dan B3. Reaksi LAMP dimulai dengan penambahan enzim Bst DNA polimerase dan dilakukan pada suhu 65°C .^{34,35}

Reaksi LAMP membutuhkan primer, DNA polimerase, bufer DNA polimerase dan nukleotida. Primer pada LAMP menggunakan primer dalam, primer luar, dan primer loop sehingga amplifikasi menjadi semakin spesifik.^{33,34,35}

Amplifikasi nukleotida berlangsung pada suhu optimal enzim DNA polimerase, yaitu antara 60° – 65°C . Penggunaan empat primer

yang terdiri dari sepasang primer luar dan sepasang primer dalam menyebabkan segmen yang teramplifikasi menjadi semakin spesifik. Primer berbentuk loop yang dihasilkan dari keempat primer memungkinkan proses amplifikasi DNA berlangsung lebih cepat.³⁴

Reaksi amplifikasi pada metode LAMP dimulai dengan penempelan primer luar pada rantai DNA. Keseimbangan ion yang dibentuk oleh bufer membantu penempelan primer luar pada urutan nukleotida tertentu sehingga dapat membuka untai DNA. Primer dalam dapat mengenali urutan nukleotida tertentu sehingga dapat menempel pada rantai DNA. Primer dalam terdiri dari dua urutan nukleotida spesifik dari rantai DNA sehingga memiliki afinitas yang lebih kuat serta dapat membentuk struktur loop pada reaksi amplifikasi dengan adanya aktivitas enzim. Penempelan primer dalam pada rantai DNA mengawali proses sintesis DNA oleh enzim Bst DNA Polimerase. Penggunaan berbagai pewarna DNA menunjukkan bahwa Etidium bromida dan SYBR Green 1 merupakan pewarna yang paling sensitif untuk mendeteksi hasil akhir amplifikasi dengan LAMP.³⁵

Metode

Dilakukan apusan pada infeksi luka operasi menggunakan lidi kapas steril, kemudian diinokulasikan pada agar darah untuk mencari *S.aureus*.

Isolasi DNA dengan cara metode pemanasan sederhana dari koloni *S. aureus*. Satu ose koloni bakteri *S.aureus* disuspensikan dalam $100\mu\text{L}$ air destilasi kemudian dipanaskan selama 10 menit. Setelah itu suspensi bakteri tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm dalam waktu 5 menit dan supernatannya digunakan untuk sampel DNA pada pemeriksaan LAMP.

Reagen untuk LAMP: primer dalam $1,6\mu\text{M}$, primer luar $0,2\mu\text{M}$ (Fermentas), MgCl_2 4

mM, dNTP 400 μ M, buffer LAMP, Bst DNA Polimerase 8 U (Biolabs), templat DNA.

Primer yang digunakan untuk gen *mecA* adalah :

F3: 5'-GCGACTTCACATCTATTAGGT-3'

B3: 5'-GCCATCTTTTTTCTTTTTCTCT-3'

FIP: 5-TCCCTTTTACCAATAACTGCATC
ATATGTTGGTCCCATTAAGTCT-3'

BIP: 5-AAGCTCCAACATGAAGATGGCC
GATTGTATTGCTATTATsCGTCA-3'

Primer ini diperoleh dari DNA sekuens dari plasmid pSA1379 yang diisolasi dari *S. aureus* IMC 1379 (Gen Bank ID: BA000018). Setiap set terdiri dari 2 primer luar (F3 dan B3) dan 2 primer dalam (FIP dan BIP).³⁵

Cara kerja untuk LAMP :

1. Buat 25 μ L larutan buffer Bst DNA polimerase dengan menambahkan, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8) sebanyak 1 μ L, 10 mM KCl sebanyak 2,5 μ L, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% sebanyak 2,5 μ L, Trixton-100 sebanyak 1 μ L, 4 μ M MgSO_4 5 μ L.
2. Tambahkan dNTP 400 μ M sebanyak 0,1 μ L
3. Tambahkan primer luar (F3 dan B3) masing-masing 0,2 μ M sebanyak 0,1 μ L dan primer dalam (FIP dan BIP), masing-masing 0,8 μ M sebanyak 0,4 μ L.
4. Tambahkan 5 μ L template DNA.
5. Tambahkan 8 μ L Bst DNA polimerase pada larutan, inkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit.
6. Panaskan pada suhu 80°C selama 2 menit untuk terminasi reaksi.
7. Deteksi menggunakan Sybr Green dilakukan dengan menambahkan 1 μ L sybr Green yang telah diencerkan (1:10) ditambahkan pada 25 μ L hasil reaksi LAMP. Amati perubahan warna, jingga berarti negatif sedangkan hijau berarti positif. Dengan lampu UV transluminator warna akan lebih terang.

Hasil

Jumlah sampel yang diambil dari pasien pascaoperasi di ruang rawat bedah RS Abdul Moeloek Bandar Lampung selama bulan Oktober 2011–Februari 2012 sebanyak 129. Dari 129 sampel yang diidentifikasi terdiri dari berbagai macam bakteri yaitu *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus* sp, *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp, *Escherichia coli* dan *Enterococcus*. Jumlah dari masing-masing bakteri diuraikan pada tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Jumlah hasil identifikasi bakteri dari sampel

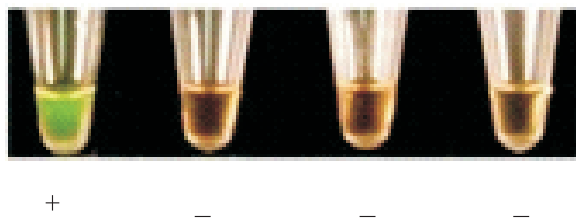
Jenis bakteri	Jumlah
<i>Staphylococcus aureus</i>	41(32%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29 (22%)
<i>Pseudomonas</i> sp	24 (19%)
<i>Klebsiella</i> sp	16 (12%)
<i>Escherichia coli</i>	10 (8%)
<i>Proteus</i> sp	7 (5%)
<i>Enterococcus</i>	2 (2%)
Total	129 (100%)

Berdasarkan hasil identifikasi sampel (Tabel 1) maka diperoleh terbanyak *Staphylococcus aureus* yaitu 41 sampel (32%). Kemudian dari 41 sampel *Staphylococcus aureus* dilakukan pemeriksaan gen *mecA* untuk skrining adanya MRSA menggunakan metode LAMP dan PCR.

Terhadap 41 sampel *Staphylococcus aureus* dilakukan pemeriksaan LAMP untuk mendeteksi adanya MRSA. Hasil pemeriksaan LAMP dan PCR dijelaskan dalam tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan LAMP

Gen <i>mecA</i> (MRSA)	Persentase
Positif	3 (7,3%)
Negatif	38 (92,7%)
Total	41 (100%)



Gambar 1. Hasil LAMP pada amplifikasi gen *mecA* MRSA

Dari 41 sampel *Staphylococcus aureus* didapatkan 3 sampel (7,3%) positif memiliki gen *mecA* yang berarti merupakan MRSA dengan pemeriksaan LAMP, dan 38 sampel (92,7%) hasilnya negatif tidak memiliki gen *mecA* yang berarti bukan MRSA.

Pembahasan

Dari hasil yang telah dicantumkan di atas didapatkan bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab terbanyak infeksi pascaoperasi di Rumah Sakit. Oleh karena itu para klinisi harus mempertimbangkan bahwa MRSA juga potensial menjadi bakteri patogen pada pasien dengan dugaan infeksi *Staphylococcus aureus*, sehingga pada pasien-pasien ini harus dilakukan kultur secara rutin serta deteksi MRSA.^{4,5}

Pada penelitian ini metode LAMP dicoba untuk digunakan sebagai metode skrining dalam mendeteksi adanya MRSA pada sampel yang langsung di ambil dari pasien. Berbagai penelitian lain tentang metode LAMP telah dilakukan diantaranya penelitian terhadap *Mycoplasma pneumonia* dengan LAMP, penelitian tentang gen *yrul* yang terdapat pada *Yersinia ruckeri* juga dengan metode LAMP.^{16,17} Selain itu penelitian lain yang sudah dilakukan untuk identifikasi suatu penyakit dengan menggunakan teknik LAMP. yaitu gen *srA* dari *Trypanosoma brucei rhodosiense*, *M. tuberculosis* juga sudah diteliti dengan metode LAMP. Hasil dari penelitian ini menunjukkan sensitivitas LAMP untuk BTA dan kultur positif 97,7%, BTA negatif dan kultur positif 48,8%. Selain itu pada tahun 2010 juga telah dilakukan

penelitian deteksi gen *femB*, *mecA* dan *qacA* menggunakan metode LAMP untuk mengetahui antiseptic-resistant *Staphylococcus aureus*.¹⁹

Simpulan, metode LAMP dapat mendeteksi gen *mecA* MRSA pada *S.aureus*. Metode LAMP dapat mendeteksi MRSA dengan lebih cepat dan murah.

Daftar Pustaka

1. Jin Ah Yang, Dae Won Park, Jang Wook Sohn, Min Ja Kim. Novel PRC-restriction fragment length polymorphism analysis for rapid typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44:236–238.
2. Nadjia RB, Michele Bes, Helene M, Fancoise F, Marie ER, Gerard L, et al. Detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus strains resistant to multiple antibiotic and carrying the *panton-valentine leukocidin* genes in Algiers Hospital. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50:1083–1085.
3. Archer, G.L. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clinical Infectious Dis*. 1998;26:1179–1181.
4. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Principles of disease and epidemiology. In: *Microbiology an introduction*. 8th ed. San Francisco: Pearson Education Inc; 2004;p 408–31.
5. Herwaldt LA, Wenzel RP. Dynamics of hospital-acquired infection. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 1995;p. 169–76.
6. Marcel J.P, Alfa M, Baquero F, Etienne J, Goossens H, Harbath S, et al. Healthcare-associated infections : think globally, act locally. *Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 2008;14:895–907.

7. Warsa UC. Perkembangan resistensi antibiotika di rumah sakit dan masyarakat. Upacara Pengukuhan Guru Besar Tetap Mikrobiologi FKUI. 2004.
8. Josowindo H, Warsa UC, Subandrio A, Sudarmono P. Perkembangan kepekaan kuman terhadap antimikroba saat ini. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 1996;46: 467–76.
9. Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR et al, Spread of methicillin-resistant *S. aureus* between the community the hospitals in Asian Countries. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, May 2011;66(5):1061–9.
10. J.A. Severin, E.S., Kuntaman M, Nasal Carriage of Methicillin-resistant and methicillin-sensitive of *staphylococcus sciuri* in the Indonesian population. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec 2010;p 5413–5417.
11. Noviana H. Isolasi dan Uji Kepekaan Isolasi Klinis ORSA dan non-ORSA terhadap vankomisin dan antibiotik lainnya. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 2004;9:51–54.
12. Simor, A.E., Googfellow, L., Louie and M. Louie. Evaluation of a new medium, oxacillin resistance screening agar base, for detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001.39:3422.
13. Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., *Diagnostic microbiology: bailey & Scotts*, 12th edition, Mosby, Missouri, 2007.
14. Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N., Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg E.A. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical microbiology*, 20th edition, Prentice-Hall International Inc, USA, 2004.
15. Mori Y, Tsuyoshi H, Tsugunoei N. Sequence specific visual detection of LAMP. Reaction by addition of cationic polymers. *Journal BMC Biotechnology*, 2006;10:1472–6750.
16. Saleh M, Halem S, Mansoer El-M, Loop mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *Journal Bioomed*. 2008;10: 1186–1748.
17. Boehme CC, Pamela N, German H, Rubhana R, Zeur R, Martinab et al. Operational feasibility of using loop mediated isothermal amplification for diagnostic or pulmonary tuberculosis in microscopic centers of development centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45: 1936–1940.
18. Murray R.P, Rosenthal, K.S., Kobayashi G.S., Tenover M.A., *Medical microbiology*, 4th edition, Mosby, Missouri, 2002.
19. Ken-Ichi Hanaki, Jun-Ichiro Sekiguchi, Kayo Shimada, Ayako Sato, Hajime Watari, Tadashi Kojima, Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of antiseptic and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Microbial Methods*, 2010.
20. White D. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*, 2nd ed., Oxford, Oxford University Press, 2000:293–300.
21. Russel AD and Chopra I. *Understanding antibacterial action and resistance*. London. Ellis Horwood. 1990: 146–81.
22. Stoppler, M. *Staph. Infection (Staphylococcus aureus)*. Diunduh pada 20 Desember 2010; Tersedia dari <http://www.medicinet.com/script/main/art?article=415>
23. Ryan, K.J., Ray, C.G., *Sherris Medical Microbiology: An introduction to infectious disease*, 4th edition, McGraw-Hill Companies, USA, 2004.
24. Rohrer S, Bischoff M, Rossi J, Bachi BB. Mechanism of methicillin-resistance, In: Fluit AC, Schmitz FJ, editors. *MRSA: Current perspectives*, Norfolk England. Caister Academic Press. 2003.31–54.

25. Hartman, BJ., and Tomasz. Expression or Methicillin-resistance in heterogenous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 1986;29:58–92.
26. Faria NA., Oliveira DC., Westh Henrik., Monnet DL., Larsen AR., Skov R., Lencastre H., Epidemiology of Emerging methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark : a Nationwide Study in a Country with low prevalence of MRSA infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43:1836–1842.
27. Huang H., Flynn NM., King JH., Monchaud C., Morita M., Cohen SH., Comparison of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MRSA infection in Sacramento, California. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44: 2423–2427.
28. Greenwood D. *Antimicrobial Chemotherapy*. 3rd ed. Oxford. Oxford University Press. 1995; Hal. 17–31.
29. Bannister, B., Gillespie, S., Jones, J *Infection Microbiology and Management*, 3rd edition, Blackwell Publishing, Australia, 2006.
30. Andra, MRSA update: Diagnosis dan Tatalaksana. 4th symposium of Indonesia antimicrobial resistance twach (IARW). Diunduh Desember 2010. Simposia. Vol. 7.No.1. <http://www.majalahfarmacia.com/rubric/MRSAupdate>.
31. Ibarra M, Flatt T, Van Maele D, Ahmed A, Fergie J, Purcell K. Prevalence of Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008; 13(12):1109–11.
32. Klein E, Smith DL, Lexminarayan R. Hospitalization and Deaths caused by Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA).
33. United States. *Emerging Infectious Disease*. 2007;13(12):1840–6. Noskin GA, et al. The Burden of *Staphylococcus aureus* on hospitals in the United States: An analysis of the 2000 and 2001 nationwide inpatient sample database. *Arch. Intern. Med*. 2005;165:1756–1761.
34. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;15;28(12): E63
35. Ken-ichi H., Jun-ichiro S., Kayo S., Ayako S., Hajime W., Tadashi K., Tohru M., Loop-Mediated isothermal amplification assay for identification of antiseptic and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*. 2011. 10. 1016.