

Polymerase Chain Reaction (PCR) Sebagai Baku Emas Identifikasi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*

Yuwono

Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang

Abstrak

Isolasi MRSA tidak mudah dilakukan karena seringkali bercampur/terkontaminasi dengan flora normal seperti *coagulase negative staphylococcus (CoNS)* yaitu *S. epidermidis* dan *Staphylococcus haemolyticus*. Hingga saat ini belum ditemukan media yang benar-benar ideal untuk isolasi dan identifikasi koloni MRSA secara langsung. Identifikasi MRSA dapat dilakukan dengan uji biokimia terhadap protein A, clumping factor, koagulase atau nuklease dan uji kepekaan terhadap antimikroba. Uji kepekaan terhadap antimikroba dapat menggunakan salah satu dari tiga media yaitu Mueller Hinton agar (MHA), Columbia agar atau DST agar. Selain itu identifikasi MRSA dapat pula dilakukan secara langsung dengan kit yang telah diproduksi secara komersial seperti latex agglutination kit untuk mengidentifikasi PBP 2a dan secara otomatis dengan mesin seperti vitek dari bioMerriex atau phoenix dari Becton Dickinson. Baku emas (gold standard) identifikasi MRSA adalah dengan mendeteksi gen conserved (tetap/terpelihara)-yang senantiasa ditemukan pada MRSA yaitu gen *mecA*. Identifikasi gen *mecA* ini dapat dilakukan dengan metode polymerase chain reaction (PCR)

Kata Kunci: Identifikasi, MRSA, PCR

Abstract

Isolation of MRSA was not quite easy because of contamination of normal flora such as *coagulase negative staphylococcus (CoNS)* i.e. *S. epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*. There are no media which suitable for isolation and identification of MRSA. Identification of MRSA were conducted by biochemistry test to protein A, clumping factor, coagulase or nuclease and antimicrobial susceptibility testing (AST). Such as media using for AST were Mueller Hinton agar (MHA), Columbia agar or DST agar. Another method to identify MRSA using a commercial kit for example latex agglutination kit for identification PBP 2a and also possible with automatic machine vitek (bioMerriex) or phoenix (Becton Dickinson). Gold standard of identification of MRSA is a detection of conserved *mecA* gene. Identification of *mecA* gene is usually use polymerase chain reaction (PCR)

Key Words: Identification, MRSA, PCR

Pendahuluan

Perang dunia kedua merupakan momen penting dalam sejarah resistensi *S. aureus* terhadap antimikroba. Berbagai manifestasi infeksi *S. aureus* termasuk sepsis, pada waktu itu dapat diatasi dengan antimikroba penisilin (*penicillin*). Tetapi dalam kurun waktu kurang dari lima tahun telah ditemukan galur (*strain*) resisten terhadap antimikroba tersebut. Bahkan pada tahun 1948 di Inggris misalnya, 60% isolat *S. aureus* telah resisten terhadap penisilin dan pada akhir tahun 1950-an di berbagai negara Eropa angka resistensi *S. aureus* terhadap penisilin telah mencapai 90% lebih. Resistensi terhadap penisilin ini terbukti terjadi karena *S. aureus* memproduksi enzim beta laktamase (penisilinase) yang dapat memecah cincin beta laktam penisilin sehingga antimikroba tersebut menjadi tidak aktif. Galur *S. aureus* resisten terhadap metisilin yang dikenal dengan sebutan *methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*.¹ *MRSA* dikenal sebagai salah satu penyebab utama infeksi nosokomial di berbagai rumah sakit di seluruh dunia (pandemi) sejak era 1980-an dengan prevalensi rata-rata 50%. Infeksi nosokomial atau infeksi di rumah sakit yang adalah disebabkan galur komunitas (*CAMRSA*). Pada eksplorasi lebih lanjut ditemukan bahwa *CAMRSA* membawa faktor virulen tambahan yaitu *Panton Valentine Leukocidin (PVL)* ⁽²⁾.

Isolasi dan Identifikasi

Isolasi *MRSA* tidak mudah dilakukan karena seringkali bercampur/terkontaminasi dengan flora

normal seperti *coagulase negative staphylococcus (CoNS)* yaitu *S. epidermidis* dan *Staphylococcus haemolyticus*. Hingga saat ini belum ditemukan media yang benar-benar ideal untuk isolasi dan identifikasi koloni *MRSA* secara langsung. Agar nutrisi/kaldu ditambah NaCl 7% pernah direkomendasikan oleh *British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)*. Media ini memiliki kelemahan karena hanya mampu menumbuhkan sebagian kecil isolat *MRSA* meskipun telah dilakukan substitusi NaCl dengan aztreonam atau asam nalidiksat + kolistin. Media lain yang digunakan untuk penapisan (screening) *MRSA* adalah agar darah dengan 4 mg/L metisilin atau 2 mg/L oksasilin, tetapi media ini juga memiliki kelemahan karena seringkali tidak mampu membedakan *MRSA* dengan CoNS. Para ahli mencoba mengganti media tersebut dengan media selektif *manitol salt agar (MSA)* dengan NaCl 7% tetapi hasilnya juga belum memuaskan. Penurunan konsentrasi NaCl menjadi 2% ternyata memberi hasil yang baik. *MSA* dengan NaCl 2% direkomendasikan baik oleh *BSAC* maupun *National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)* dan pada saat ini secara luas digunakan di seluruh dunia untuk mengisolasi *MRSA*^(1,2).

Identifikasi *MRSA* dapat dilakukan dengan uji biokimia terhadap protein A, *clumping factor*, koagulase atau nuklease dan uji kepekaan terhadap antimikroba. Uji kepekaan terhadap antimikroba dapat menggunakan salah satu dari tiga media yaitu *Mueller Hinton agar (MHA)*, *Columbia agar* atau *DST agar*. Selain itu

identifikasi *MRSA* dapat pula dilakukan secara langsung dengan kit yang telah diproduksi secara komersial seperti *latex agglutination kit* untuk mengidentifikasi PBP 2a dan secara otomatis dengan mesin seperti *vitek* dari *bioMerriex* atau *phoenix* dari *Becton Dickinson*. Baku emas (*gold standard*) identifikasi *MRSA* adalah dengan mendeteksi gen *conserved* (tetap/terpelihara)-yang senantiasa ditemukan pada *MRSA* yaitu gen *mecA*. Identifikasi gen *mecA* ini dapat dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)^(3,4).

Pendeteksian resistensi *MRSA* dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode dilusi atau metode cakram menggunakan oksasilin (bukan metisilin). Oksasilin digunakan karena secara kimia satu golongan dengan metisilin, lebih stabil, hasil uji antara metisilin dan oksasilin sama dan pada saat ini metisilin tidak lagi diproduksi secara komersial sehingga yang ada di pasaran adalah oksasilin. Akhir-akhir ini dikatakan bahwa penggunaan cefoxitin lebih akurat dibandingkan dengan oksasilin^(3,5).

Pada metode dilusi digunakan medium MHA atau *Columbia* ditambah 2% NaCl. Oksasilin *stock* dibuat dengan melarutkan bubuk oksasilin dalam air steril dan dibuat konsentrasi bervariasi 10^2 , 10^3 , 10^4 mg/L. Dilakukan pengenceran sehingga didapatkan satu seri larutan oksasilin mulai dari 0.125 mg/L hingga 12.8 mg/L dan satu tabung tanpa oksasilin (0 mg/L). Medium dipanaskan hingga 50°C dan dituangkan ke tabung kemudian didinginkan. Inokulum dibuat dalam media MHA dengan konsentrasi sekitar 10^4

cfu/spot (dapat diukur kesetaraannya dengan McFarland standard). Masing-masing tabung larutan oksasilin dengan konsentrasi berbeda yang telah dibuat diberi 1-2 μ L suspensi kuman kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 30°C. Pembacaan dengan melihat ada tidaknya hambatan pertumbuhan dan diinterpretasikan sensitif bila tumbuh pada konsentrasi oksasilin ≤ 2 mg/L dan resisten bila tumbuh pada konsentrasi oksasilin ≥ 4 mg/L. Sebagai galur kontrol sensitif digunakan *S. aureus* ATCC 29213 atau NCTC 6571 dan galur resisten *S. aureus* NCTC 12493⁽³⁾.

Pada metode cakram digunakan media MHA atau *Columbia* ditambah 2% NaCl. Inokulasi dilakukan dengan *sterile swab* pada permukaan medium kemudian diletakkan cakram oksasilin 1 μ g dan diinkubasi 24 jam pada suhu 30°C. Pembacaan zona hambatan minimal (*minimal inhibitory concentration/MIC*) dalam skala millimeter (mm) dengan interpretasi sensitif bila zona hambatannya ≥ 15 mm dan resisten zona hambatannya ≤ 14 mm. Sebagai galur kontrol sensitif digunakan *S. aureus* ATCC 25923 atau NCTC 6571⁽³⁾.

Pendekatan Biologi Molekuler

Sekitar satu abad lamanya, para ahli mikrobiologi menerapkan dan mengembangkan sistem identifikasi dan karakterisasi (*microbiological typing system* atau biasa disingkat *typing* saja) galur *S. aureus* berdasarkan ciri fenotip. Pada pendekatan fenotipik dilakukan karakterisasi produk gen untuk mengidentifikasi dan membedakan antar

galur berdasarkan profil biokimia, keberadaan antigen, kepekaan terhadap faga (*phage typing*) dan analisa keseluruhan protein dengan *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE). Parameter keberhasilan *typing* ditentukan oleh kehandalan metode tersebut dalam mengidentifikasi dan mengkarakterisasi (*typeability*), jika diulang mendapatkan hasil yang sama (*reproducibility* atau *reliability*), stabilitas (*stability*) dan derajat pembedaan (*discriminatory power*). *Typing* fenotipik memiliki keterbatasan pada semua aspek parameter tersebut. Oleh karena itu sejak 30 tahun terakhir kebanyakan pusat penelitian dan pelayanan mikrobiologi kedokteran menggunakan *typing* genotip. Terlebih lagi saat ini telah tersedia ratusan *software* program filogenetik untuk membantu menganalisa berbagai pita (*band*) hasil elektroforesis, sekuen DNA dan hasil hibridisasi sehingga *typing* genetik menjadi lebih akurat dan efisien⁽⁶⁾.

Tujuan *typing* secara epidemiologi adalah untuk mendefinisikan hubungan antar galur yang diisolasi dari tempat dan waktu tertentu misalnya pada saat wabah, sedangkan survailans dan analisa genetika populasi bertujuan untuk mengungkap hubungan antar galur dalam periode yang lebih lama (bulan dan tahun) dan mencakup geografi yang luas misalnya negara atau antar negara. Pada saat wabah (*outbreak*) ditemukan peningkatan infeksi dan atau ditemukan pola resistensi yang berbeda dengan data sebelumnya. Penelusuran dan perbandingan galur penyebab wabah ditujukan untuk mengetahui jenis dan jumlah galur yang

terlibat, penerapan terapi yang tepat, pembatasan penyebaran bakteri dan evaluasi keberhasilan program pengendalian infeksi⁽⁶⁾.

Asumsi dasar *typing* bahwa keterkaitan antar galur bakteri merupakan hasil turunan dari satu prekursor, artinya antar galur dalam satu spesies memiliki sifat yang sama (saling berbagi) tetapi berbeda secara nyata dengan spesies lainnya. Keanekaragaman (*diversity*) genetik didasari adanya berbagai mutasi seperti akumulasi mutasi titik (*point mutation*), *genetic rearrangement* dan akuisisi (pengambilan) atau kehilangan elemen genetik kromosomal maupun ekstrakromosom. Perlu diingat bahwa keseluruhan materi genetik pada bakteri (genom) terdapat dalam kromosom tunggal termasuk didalamnya *insertion sequence* dan *transposon* (Tn) dan pada ekstra kromosom seperti plasmid. Genom *Staphylococcus* tersusun atas berbagai gen yang *conserved* dan gen *mobile* yang diperoleh secara transfer horizontal dari galur/spesies lainnya yang membawa determinan resistensi atau faktor virulen. SCC*mec* merupakan struktur yang sangat bervariasi (*mosaic structure*) dan merupakan contoh rekombinasi genetik yang sangat bagus. Di dalamnya terdapat determinan resistensi utama yaitu *mecA* dan berbagai kombinasi *transposon*, *insertion sequence* dan *plasmid sequence*. SCC*mec* diperkirakan sangat aktif ditransmisi antar spesies *Staphylococcus* secara *in vivo*. Variasi elemen genetik pada SCC*mec* mengindikasikan bahwa elemen ini kemungkinan terbentuk karena pertukaran materi genetik secara horizontal

dengan spesies *Staphylococcus* lainnya dan karena pengaruh lingkungan (habitat) bakteri tersebut⁽⁷⁾.

S. aureus termasuk *MRSA* memiliki variasi genetik yang sangat tinggi, lebih dari 20% materi genetiknya merupakan elemen yang dapat berpindah (*mobile*). Sejauh ini telah ditemukan 18 regio DNA spesifik yang diperkirakan menyandi faktor virulensi. Metode *typing* genetik ditujukan untuk mengungkap faktor virulen ini dan memperkirakan proses patogenesisnya misalnya temuan gen yang menyandi *Panton Valentine leukocidin* pada *CAMRSA* yang menyebabkan *necrotising pneumonia* pada pasien dengan imunitas normal⁽⁷⁾.

Sejauh ini *typing* genetik (molekuler) *S. aureus* termasuk *MRSA* telah mengalami 4 fase yaitu fase pertama berupa analisa profil plasmid, fase kedua *southern hybridization analysis* dari kromosom, fase ketiga PCR dan PFGE dan fase keempat *sequence typing* dan *probe mediated typing*⁽⁸⁾.

Analisa plasmid pada *MRSA* mulai diterapkan pada pertengahan tahun 1970-an. Metode ini mengandung keterbatasan karena meskipun 90% *MRSA* mengandung plasmid tetapi galur pembandingnya yaitu *MSSA* kurang dari 50% yang memiliki plasmid serupa. Selain itu variasi struktur plasmid seperti *supercoiled*, *nicked*, linear dan oligomerik merupakan faktor perancu dalam mengkarakterisasi plasmid itu sendiri. Problem ini diatasi dengan memotong (*digestion*) plasmid menjadi fragmen tertentu kemudian menganalisa jumlah dan ukuran potongan tersebut⁽⁷⁾.

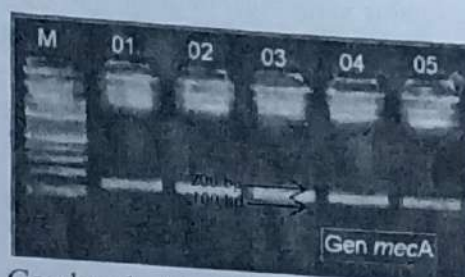
Kromosom merupakan molekul target untuk mengetahui hubungan antar bakteri. *Southern blot analysis* juga mulai diterapkan pada pertengahan tahun 1970-an ditujukan untuk mendeteksi DNA spesifik pada kromosom yang sesuai (homolog) menggunakan pelacak (*probe*). Pemilihan *probe* menjadi titik krusial (kritis) karena menentukan parameter *typeability* dan *discriminatory power*. Contoh sukses metode ini adalah *ribotyping* yaitu karakterisasi polimorfisme pada ribosom, multi *probe* untuk *insertion sequence*, transposon, gen *mecA* dan gen virulen seperti gen penyandi protein A. Polimorfisme pada gen ribosomal ini juga dapat dikarakterisasi dengan PCR⁽⁷⁾.

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan satu inovasi paling penting dalam biologi molekuler. Prinsip dasar kerja PCR yang mulai diterapkan pada tahun 1986 adalah melipatgandakan secara eksponensial (*amplification*) bagian tertentu dari DNA target sehingga didapatkan sejumlah besar salinan (*amplicon*) yang kemudian dengan mudah dapat dianalisa dengan elektroforesis gel. Umumnya PCR digunakan untuk menganalisa satu atau beberapa gen saja misalnya gen *mecA* dan gen regulatornya. Amplikon tertentu misalnya gen koagulase *MRSA* dapat dianalisa dengan cara pemotongan dengan enzim restriksi (*restriction endonuclease enzyme*) kemudian dilakukan elektroforesis. Cara ini dikenal dengan sebutan *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). PCR juga sangat berhasil dalam mendeteksi *repetitive sequence* terutama pada genom

eukariot. Analisa *repetitive sequence* pada *MRSA* hanya menghasilkan resolusi yang moderat sehingga metode ini tidak digunakan lagi untuk *typing MRSA*. Demikian pula metode *arbitrarily primed PCR (AP-PCR)* atau *randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD)* yaitu *typing MRSA* berdasarkan variasi kromosom menggunakan primer yang pendek (10bp) hanya menghasilkan akurasi/resolusi yang moderat, sehingga jarang digunakan. Pengembangan metode PCR yang dapat mengamplifikasi sekitar 40% genom *MRSA* disebut *amplified fragment length polymorphism analysis (AFLP)*. Pada metode ini fragmen genom diligasi dengan nukleotida *adapter* yang disebut *linker* dan *indexer* kemudian dilakukan PCR menggunakan *adapter specific primer*⁽⁹⁾.

Pemotongan genom *MRSA* dengan enzim restriksi menghasilkan fragmen berukuran besar yang sulit dianalisa dengan elektroforesis. Problem ini berhasil diatasi oleh Schwartz dan Cantor pada tahun 1984 dengan memodifikasi aliran listrik pada gel yang disebut metode *pulse field gel electrophoresis (PFGE)*. Pada PFGE, fragmen DNA akan menempati lokasi tertentu berdasarkan orientasinya dan bukan berdasarkan kecepatannya. PFGE disebut sebagai *gold standard* untuk *MRSA typing* karena dapat memisahkan sejumlah besar fragmen DNA dari kromosom. Kesulitan yang dihadapi dalam menerapkan metode ini adalah dalam menginterpretasikan pita DNA pada gel dan *reproducibility*-nya. Oleh karena itu saat ini dilakukan standardisasi teknik

dan interpretasi secara internasional agar kedua masalah tersebut teratasi⁽⁹⁾.



Gambar 1. Amplikon gen *mecA* hasil PCR dengan berat molekul sekitar 147 bp (sumber: Yuwono, 2009).

Fase keempat dari *typing* genetik adalah *sequence typing* dan *probe mediated typing*. *Sequence typing* atau secara singkat sering disebut *sekuensing* adalah metode mengidentifikasi urutan asam nukleat pada genom. Dari segi ketepatan, metode ini menghasilkan ketepatan identifikasi nyaris 100%. Melakukan *sekuensing* pada seluruh genom hampir dikatakan tidak mungkin karena banyaknya galur yang harus disekuensing. Sejauh ini baru tersedia sekuen lengkap genom *MRSA* galur N315 dan galur Mu50 yang memiliki SCC*mec* tipe II. Untuk itu para ahli mengusahakan memetakan bagian yang variatif dan yang *conserved* dalam genom agar *sekuensing* hanya dilakukan pada bagian tertentu dari genom tetapi hasilnya efisien. Usaha ini berhasil setelah ditemukan cara karakterisasi bakteri berdasarkan perbedaan *house keeping genes* yaitu beberapa gen yang menyandi beberapa protein yang menentukan kehidupan bakteri (*viability*). Umumnya satu bakteri mengandung 6-7 fragmen *house keeping gene*. Tiap fragmen gen diidentifikasi jenis

alelnya kemudian digabungkan secara keseluruhan hingga didapat kombinasi khas tiap galur yang disebut *sequence type* (ST). Isolat dengan pola alel yang sama diartikan memiliki korelasi klonal. Akhir-akhir ini terdapat satu metode yang disebut *multilocus sequence typing* (MLST) yaitu data ST dimasukkan pada program komputer untuk dibandingkan dengan ST dari berbagai tempat/negara. Data ini dapat diakses via internet. Dalam hal *discriminatory power*, MLST merupakan metode yang paling akurat untuk melacak asal-usul dan penyebaran (filogeni dan evolusi) *MRSA*¹⁰.

Pada prinsipnya *probe mediated typing* adalah cara karakterisasi berdasarkan prinsip hibridisasi. Pelacak dibuat berdasarkan data gen atau sekuen spesifik pada bakteri sehingga dapat mengenali bakteri mulai dari tingkat genus, spesies hingga galur. Jika *probe* tidak terhibridisasi berarti bakteri tersebut tidak memiliki sekuen homolog dengan *probe* ini. Data sekuen *probe* yang telah dibuat disimpan dalam *database* komputer sehingga sewaktu-waktu dapat diakses dan digunakan untuk *typing* di tempat lain. Problem yang dihadapi sebagaimana problem hibridisasi adalah tingkat ketepatan hibrid antara *probe* dan sekuen spesifik pada bakteri target.¹⁰

Semua metode *typing* yang dibicarakan di atas adalah karakterisasi asam nukleat secara struktural. Para ahli juga telah berhasil mengembangkan *typing* asam nukleat secara fungsional dalam rangka menjelaskan hubungan patogen-inang, mekanisme kerja faktor virulen (*pathotype*) dan mekanisme kerja faktor

resisten (*resistotype*). *Multiplex PCR* menggunakan multi primer digunakan untuk mengidentifikasi berbagai faktor virulen *S. aureus*, hubungannya dengan latar belakang genetik, distribusi faktor virulen tersebut diantara berbagai galur, regulator faktor virulen dan patogenesis faktor virulen pada penyakit infeksi. Metode lain untuk mengkarakterisasi fungsi genom *MRSA* adalah *DNA micro array*. Pada metode ini dilakukan deteksi ekspresi gen (transkripsi) dalam *plate* berisi banyak sampel sekaligus kemudian diinterpretasi menggunakan program komputer.¹⁰

Daftar Pustaka

1. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H and Wecke J. 1998. Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol Biol Rev.* 62:1371-1414.
2. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. 2010. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* Jan 8;6(1):e1000715.
3. Brown D, and Cookson B. 2003. Detection of *MRSA*, p 11-30. In Fluit Ad C, and Franz-Josef Schitz (editors), *MRSA: Current perspectives*. Caister Academic Press, Norfolk England.

4. Nuria Mir, Miguel Sánchez, Fernando Baquero, Blanca López, Celia Calderón, and Rafael Cantón. 1998. Soft Salt-Mannitol Agar-Cloxacillin Test: a Highly Specific Bedside Screening Test for Detection of Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 36: 986-989.
5. Van Leeuwen WB. 2003. Molecular approaches for the epidemiological characterization of *S. aureus* strain, p 55-95. In Fluit Ad C, and Franz-Josef Schitz (editors), *MRSA: Current perspectives*. Caister Academic Press, Norfolk England.
6. Jonas D, Speck M, Daschner F. D, and Grundmann H. 2002. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. *J Clin Microbiol.* 40: 1821-1823.
7. Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. *J Clin Microbiol.* 2009 Jan;47(1):217-9.
8. Enright MC, Nicholas P. J. Day, Catrin E. Davies, Sharon J. Peacock, and Brian G. Spratt. 2000. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin Microbiol.* 38: 1008-1015.
9. Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A, Sharma YD. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by PCR-RFLP of SPA gene: a reference laboratory perspective. *Indian J Med Microbiol.* 2009 Apr-Jun;27(2):116-22.
10. Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, van Santen-Verheувel MG, van der Heide HG, Grundmann H, Heck ME, de Neeling AJ. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *PLoS One.* 2009;4(4):e5082.
11. Paule SM, Mehta M, Hacek DM, Gonzalzes TM, Robicsek A, Peterson LR. Chromogenic media vs real-time PCR for nasal surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact on detection of MRSA-positive persons. *Am J Clin Pathol.* 2009 Apr;131(4):532-9.
12. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res.* 2008 Jan;127(1):78-84.
13. Yuwono. 2009. MRSA: Disertasi. FK Unpad Bandung