

# Performa *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX) yang disuplementasikan dengan Cefotaxime sebagai Medium Selektif Untuk Skrining ESBL-*E.coli* dari Sampel Lingkungan

## **PERFORMANCE OF TRYPTONE BILE X-GLUCURONIDE (TBX) SUPPLEMENTED WITH CEFOTAXIME AS SELECTIVE MEDIUM FOR ESBL-E. coli SCREENING FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES**

Tati Febrianti<sup>1\*</sup>, Sundari Nursofiah, Novi Amalia, Dwi Febriyana, Ratih Dian Saraswati, Nelly Puspendari, Sunarno, dan Efadeswarni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes RI, Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta 10560, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Kualitas dan Laboratorium Lingkungan, Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan RI, Kawasan Puspiptek Serpong Gd.210 Kota Tangerang Selatan, Banten 15314,

\*Email: tatifebri@gmail.com.

*Submitted : 19-11-2020, Revised : 13-01-2021, Revised : 20-01-2021, Accepted : 02-02-2021*

### **Abstract**

*Identification of ESBL-E.coli from environment without selective medium will be challenging to do considering that E.coli mixes with various other microorganisms in the environment. This study aimed to determine the performance of TBX Agar supplemented with Cefotaxime as a selective medium for ESBL-E. coli screening from 138 water samples of environmental sampling obtained from rivers, open sewers in the market, poultry slaughterhouses and hospital waste water inlets and outlets around Jakarta. Laboratory examinations were carried out through the filtration stage, inoculation on the TBX Agar supplemented with Cefotaxime medium as well as species confirmation and ESBL with the indol test and double-disk test. The results showed that 87.08% (40-100%) of suspect colonies growing on TBX Agar supplemented with Cefotaxime medium were confirmed as E.coli and 82.51% (12-100%) were confirmed as ESBL-E.coli. However, there was no correlation between TBX Agar supplemented with Cefotaxime performance and sampling locations. Based on the results of the study, it can be concluded that the TBX supplemented with Cefotaxime medium can be used for ESBL-E.coli screening in the environment, but further confirmation is needed using the indole and double-disk tests.*

*Keywords: Escherichia coli, ESBL, TBX Agar supplemented with Cefotaxime*

### **Abstrak**

Identifikasi ESBL-*E.coli* tanpa medium selektif akan sangat sulit dilakukan pada sampel lingkungan mengingat ESBL-*E.coli* bercampur dengan berbagai mikroorganisme lainnya. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui performa TBX Agar yang disuplementasi Cefotaxime sebagai medium selektif untuk skrining ESBL-*E.coli*. Sampel penelitian sebanyak 138 sampel air lingkungan yang diambil dari sungai, saluran pembuangan terbuka di pasar, rumah pemotongan hewan unggas (RPHU) serta inlet dan outlet limbah rumah sakit di sekitar Jakarta. Pemeriksaan laboratorium melalui tahapan filtrasi, inokulasi pada medium TBX Agar dengan suplementasi Cefotaxime serta konfirmasi spesies dan ESBL dengan uji indol dan double-disk test. Hasil menunjukkan bahwa koloni tersangka yang tumbuh pada medium TBX Agar dengan suplementasi Cefotaxime sebanyak 87,08% (40-100%) terkonfirmasi sebagai *E.coli* dan 82,51% (12-100%) terkonfirmasi sebagai ESBL-*E.coli*. Namun, tidak ada hubungan antara performa TBX Agar dengan suplementasi Cefotaxime dengan lokasi pengambilan sampel. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa medium TBX Agar dengan suplementasi Cefotaxime cocok digunakan untuk skrining ESBL-*E.coli* di lingkungan namun tetap diperlukan konfirmasi lanjut menggunakan uji indol dan double disk test.

Kata kunci: *Escherichia coli*, ESBL, TBX Agar supplemented with Cefotaxime

## PENDAHULUAN

*Escherichia coli* merupakan bakteri *fecal coliform* dan keberadaannya dijadikan sebagai indikator mikrobiologi pencemaran air di lingkungan.<sup>1,2</sup> Sebanyak 2,8% *E.coli* hasil isolasi dari sampel air sungai dan danau memproduksi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).<sup>3</sup> *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) adalah enzim dimediasi plasmid yang dapat menghidrolisis cincin  $\beta$ -lactam pada *penicillin*, *cephalosporin* generasi pertama hingga ketiga, dan *aztreonam* kecuali *cephamycin* atau *carbapenem*.<sup>4-6</sup>

*Escherichia coli* termasuk salah satu bakteri gram negatif utama penghasil ESBL yang dijadikan fokus masalah kesehatan global terkait resistensi.<sup>7</sup> Kontaminasi lingkungan oleh ESBL-*E.coli* dapat ditemukan pada aliran air sungai, sekitar tempat pemotongan hewan, sekitar peternakan unggas, di tanah maupun limbah rumah sakit.<sup>1,5,6,8-10</sup> Keberadaan *E.coli* dan ESBL-*E.coli* pada lingkungan berpotensi sebagai ancaman bagi kesehatan manusia.<sup>1,5,8,11</sup> Prevalensi ESBL-*E.coli* di sungai utama daerah Polandia mencapai 14,29%.<sup>12</sup> *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase -E.coli* dari sumber air dan beberapa titik di lingkungan sekitar tempat pemotongan hewan di Bogor mencapai 14,3 persen.<sup>11</sup> Sementara itu, keberadaan ESBL-*E.coli* dari limbah Rumah Sakit di Nepal dilaporkan mencapai 57,1%.<sup>13</sup>

Diperlukan pengetahuan tentang fisiologi mikroba yang baik untuk dapat melakukan isolasi ESBL-*E.coli* dari sampel lingkungan agar dapat dipisahkan dari bakteri lainnya. Oleh karena itu, untuk mendeteksi ESBL-*E.coli* dapat digunakan medium selektif berupa *fluorogenic medium* atau *chromogenic medium*.<sup>14</sup> Pada penelitian ini digunakan medium selektif *Tryptone Bile X-glucuronide (TBX)* Agar dengan suplementasi Cefotaxime untuk skrining ESBL-*E.coli*. Medium TBX memiliki sensitivitas paling tinggi jika dibandingkan dengan *chromogenic medium* lainnya untuk isolasi ESBL-*E.coli*. Namun selama ini penggunaan TBX dengan suplementasi Cefotaxime untuk skrining ESBL-*E.coli* pada sampel air dari lingkungan belum banyak dilaporkan. Cefotaxime digunakan sebagai antibiotik golongan  $\beta$ -lactam spektrum

luas untuk menunjang deteksi bakteri gram negatif yang mampu memproduksi ESBL.<sup>15</sup>

Penelitian ini merupakan bagian dari *Global Surveillance ESBL E.coli*, surveilans *antimicrobial resistance* (AMR) dengan pendekatan *One Health*. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui performa TBX Agar dengan suplementasi Cefotaxime untuk skrining ESBL-*E.coli* pada sampel air dari sungai, saluran pembuangan terbuka di pasar, rumah pemotongan hewan unggas (RPHU) dan limbah rumah sakit di wilayah Jakarta. Hal ini akan bermanfaat bagi peneliti atau petugas laboratorium dalam memilih medium untuk skrining ESBL-*E.coli* pada sampel lingkungan.

## BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian terdiri atas sampel air dari sungai, saluran pembuangan air limbah terbuka di pasar dan RPHU, serta *inlet* dan *outlet* limbah rumah sakit di sekitar Jakarta. Penelitian ini merupakan kerja sama antara Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (Puslitbang BTDK), Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan beserta Pusat Penelitian dan Pengembangan Kualitas dan Laboratorium Lingkungan (P3KLL), Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan dan WHO Indonesia. Persetujuan etik diperoleh dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan No. : LB.02.01/2/KE014/2019 tahun 2019.

### Pengambilan Sampel

Metode sampling mengacu pada pedoman *Global Surveillance ESBL E.coli*. Sampel diambil dari minimal 4 titik sampling yang mewakili 4 jenis sampel dengan pengambilan minimal 6-8 kali pada masing-masing titik. Empat titik sampling meliputi 3 titik sungai (*upstream*, *downstream* dan *communal*) dan satu titik pasar atau RPH.<sup>16</sup> Dalam penelitian ini ditambahkan sampel limbah RS atas masukan konsultan Epi-X dari *Queensland University*. Total sampel air sebanyak 138 dengan volume masing-masing 100ml. Sampel ditempatkan dalam *box transport*/penyimpanan dengan suhu 4°C untuk kemudian diperiksa di laboratorium dalam waktu 24 jam.<sup>16,17</sup>

### Preparasi Sampel, Isolasi dan Skrining *E.coli* ESBL

Pemeriksaan laboratorium dilakukan mulai dari tahapan filtrasi, inokulasi pada medium *TBX* Agar dengan suplementasi Cefotaxime serta konfirmasi spesies dan *ESBL* dengan uji *indol* dan *double-disk test*. Masing-masing sampel dihomogenisasi kemudian dilakukan pengenceran serial 10 kali lipat untuk memperoleh kisaran koloni yang dapat dihitung. Sampel sebanyak 100ml dari masing-masing titik sampling disaring menggunakan membran filter (0,45µm) dan ditumbuhkan pada *TBX* Agar yang disuplementasi dengan *Cefotaxime* 4µg/ml (untuk enumerasi dan isolasi *ESBL-E.coli*). Inkubasi dilakukan selama 1x24 jam dengan suhu 35°C. Koloni yang berbentuk bulat, berwarna biru hijau dan dikelilingi zona keruh diduga sebagai *ESBL-E.coli*. Konfirmasi dilakukan terhadap 5 koloni presumptive *ESBL-E.coli* yang diambil secara acak dari setiap sampel.<sup>17</sup>

### Uji Konfirmasi *E.coli* dan *ESBL-E.coli*

Uji konfirmasi presumptive *E.coli* dilakukan secara konvensional dengan uji biokimiawi menggunakan indol. Uji indol merupakan uji biokimia menggunakan Kovac's reagen untuk identifikasi kemampuan bakteri dalam menghasilkan indol dari *tryptophan*. Sebanyak 1 ose bakteri diinokulasikan secara aseptik pada tabung biakan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji Indol positif pada *E.coli* ditunjukkan dengan adanya cincin merah pada bagian atas akibat reaksi indol dengan aldehid. Cincin merah tersebut memudar oleh gerakan yang tiba-tiba, sehingga cincin menjadi pecah dan menghasilkan warna merah muda.<sup>18,19</sup>

Seluruh isolat yang terkonfirmasi sebagai *E.coli* dilanjutkan dengan uji konfirmasi *ESBL-E.coli* menggunakan *double disk test*.<sup>17</sup> Suspensi isolat dipersiapkan dengan kekeruhan setara 0,5 McFarland kemudian diinokulasi pada medium Mueller-Hinton Agar. Cakram Clavulanic acid-Amoxicillin (30µg) ditempatkan di tengah Mueller-Hinton Agar, sementara cakram Ceftazidime (30µg) dan Cefotaxime (30µg) ditempatkan 15 mm dari tepi cakram Clavulanic acid-Amoxicillin kemudian diinkubasi selama 24 jam. Interpretasi dilakukan sesuai CLSI.<sup>20</sup>

### Analisis Data

Data dianalisis menggunakan SPSS versi 16.

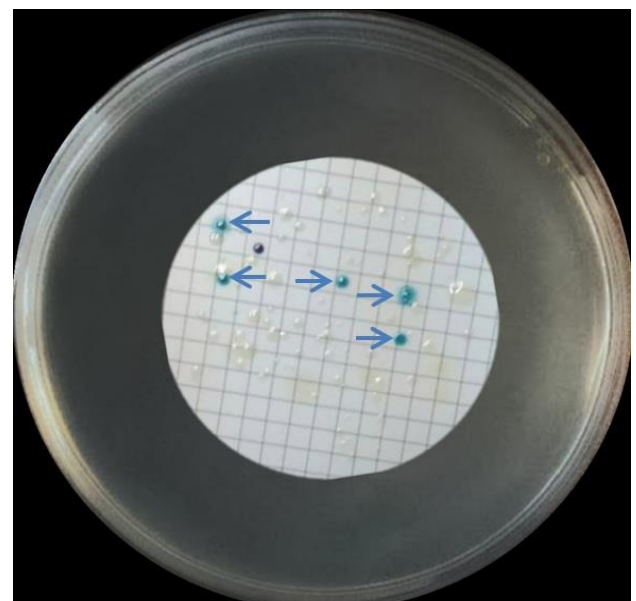
### HASIL

Distribusi sampel berdasarkan jenis lokasi pengambilan (Tabel 1.)

**Tabel 1. Distribusi Sampel Lingkungan**

Lokasi	n	%
sungai	60	43,5
pasar	40	29
RPHU	20	14,5
RS	18	13
Total	138	100

Sampel diinokulasi pada medium selektif *TBX* dengan *suplementasi Cefotaxime*. Gambaran koloni yang diduga sebagai *E.coli* penghasil *ESBL* pada media *TBX* dengan *suplementasi Cefotaxime* (Gambar 1.) berwarna biru kehijauan.



**Gambar 1. Koloni yang diduga *ESBL-E.coli* pada media *TBX* dengan *suplementasi Cefotaxime*: koloni berwarna biru/biru kehijauan (tanda panah).**

Uji indol dilakukan terhadap koloni tersangka yang tumbuh pada medium *TBX* dengan *suplementasi Cefotaxime* untuk konfirmasi spesies dan uji dilakukan terhadap semua koloni terkonfirmasi *E.coli* (Tabel 2).

**Tabel 2. Persentase Koloni *E.coli* dan ESBL-*E.coli* Terkonfirmasi**

	Persentase koloni terkonfirmasi <i>E.coli</i>	Persentase koloni terkonfirmasi ESBL- <i>E.coli</i>
Min	40	12
Max	100	100
SD	12,197	15,376
Rata-rata	87,08	82,51

Uji One Way ANOVA dilakukan terhadap koloni *E.coli* dan ESBL-*E.coli* dari masing-masing lokasi pengambilan sampel (Tabel 3).

**Tabel 3. Analisis Pengaruh Lokasi Pengambilan Sampel Terhadap Persentase Koloni ESBL-*E. coli* Terkonfirmasi**

	Pasar	Sungai	RPHU	RS	Nilai p*
Persentase <i>E.coli</i>					0,843
Minimum	40	60	70	60	
Maksimum	100	100	100	100	
Rata-rata	87,00	86,44	87,00	89,44	
SD	14,17	11,71	9,23	11,1	
Persentase ESBL <i>E.coli</i>					0,937
Minimum	40	12	56	60	
Maksimum	100	100	100	100	
Rata-rata	83,15	81,86	81,70	84,11	
SD	16,84	16,43	11,24	13,11	

\*one way ANOVA

Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara presentase *E.coli* dan ESBL-*E.coli* pada masing-masing lokasi pengambilan sampel sehingga *post hoc test* tidak dilakukan.

Hasil konfirmasi dengan uji indol menunjukkan bahwa sekitar 87,08% (40-100%) sampel yang diperoleh dari sungai, pasar, RPHU dan limbah RS mengandung bakteri *E.coli*. Dari hasil tersebut, setelah diuji dengan *double disk test*, 82,51% (12-100%) dari *E.coli* yang diperoleh merupakan penghasil ESBL. Tidak ada perbedaan signifikan antara persentase *E.coli* dan ESBL-*E.coli* yang tumbuh pada medium *TBX* Agar dengan suplementasi Cefotaxime dari berbagai lokasi.

## PEMBAHASAN

Koloni *E.coli* tersangka penghasil ESBL pada medium ditunjukkan dengan ciri koloni bulat, halus, dan berwarna biru-hijau (Gambar 1). Sejalan dengan beberapa penelitian terkait, ESBL-*E.coli* yang ditumbuhkan pada *chromogenic medium* menunjukkan morfologi bulat berwarna biru kehijauan.<sup>20-22</sup> Sekitar 97% strain *E.coli* memiliki enzim  $\beta$ -D-glucuronidase (GUD), yang tidak dimiliki oleh *coliform* lain.<sup>14</sup> Enzim tersebut dapat memecah substrat fluorogenik berupa *4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide* (MUG) dengan menghasilkan fluorogen pada medium ketika ditumbuhkan pada suhu 44°C selama 24 jam.<sup>2</sup> Enzim tersebut juga dapat menghidrolisis substrat *chromogenic* sehingga setelah inkubasi, koloni tumbuh dengan warna tertentu yang menunjukkan identifikasi spesifik dan tidak dibutuhkan uji biokimia lanjutan untuk uji presumtif.<sup>23</sup> Penggunaan *Cefotaxime* sebagai salah satu generasi ketiga *cephalosporin* umumnya ditambahkan pada media ataupun digunakan sebagai indikator pada pengujian kerentanan untuk monitoring dan skrining ESBL *E.coli*.<sup>24-29</sup> Warna biru-hijau yang dari koloni tersebut mengindikasikan adanya aktivitas  $\beta$ -D-glucuronidase.<sup>30</sup> *Tryptone Bile X-glucuronide Agar* termasuk dalam kelompok *Chromogenic Medium*. *Chromogenic Medium* terbukti paling sensitif dan spesifik dalam mendeteksi *E.coli thermotolerant* dari sampel air minum dibandingkan dengan menggunakan *fluorogenic medium*.<sup>14</sup>

Isolasi *E.coli* berdasarkan beberapa referensi dapat menggunakan *fluorogenic medium* dan *chromogenic medium*. Beberapa *fluorogenic medium* yang digunakan untuk isolasi *E.coli* dari sampel lingkungan diantaranya *Fluorocult MacConkey Agar* (MCA), *Fluorocult ECD Agar* (ECD), *Fluorocult VRB Agar* (VRB), *Fluorocult E.coli 0157:H7 Agar* (ECH7) dan *Fluorocult Brilla Broth* (BB), sedangkan *chromogenic medium* yang digunakan yaitu *Chromogenic Chromocult Agar* (CCA).<sup>14</sup>

*Tryptone Bile X-glucuronide Agar* merupakan media yang didesain untuk mendeteksi seluruh jenis *E.coli* termasuk

*Shigatoxin-Producing E.coli* (STEC) maupun non STEC. Jika dibandingkan dengan medium isolasi *E.coli* lain seperti *Rainbow Agar O157* (RB), *Rapid E.coli O157:H7* (RE), *Modified MacConkey Agar* (mMac), *CHROMagar™* STEC (Chr ST) dan *chromID™* EHEC (ChrID), *TBX Agar* merupakan salah satu medium yang direkomendasikan untuk isolasi dan enumerasi *E.coli* dari lingkungan, dan telah banyak digunakan khususnya untuk pangan.<sup>30,31</sup> Pada pengujian sampel air yang digunakan untuk keperluan mandi di daerah pesisir maupun pedalaman, telah dibuktikan bahwa TBX merupakan medium yang cocok digunakan untuk monitoring *E.coli* menggunakan metode membran filtrasi.<sup>31</sup>

*Tryptone Bile X-glucuronide Agar* termasuk kelompok *Chromogenic* medium yang mengandung *bile salt*. Tingginya kandungan *bile salt* dalam medium dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan terdapat indikasi efek untuk pertumbuhan *coliform*, sehingga konsentrasi yang digunakan harus tepat. Dalam uji standar, *E.coli* didefinisikan sebagai bakteri *coliform* dengan ciri biokimia berupa laktosa positif, oksidase negatif dan indol positif. Dalam uji cepat (*rapid test*), *E.coli* disebutkan dapat membentuk indol dari triptofan yang ditambahkan pada medium padat.<sup>31</sup>

Distribusi *ESBL-E.coli* di perairan mencerminkan adanya penyebaran bakteri tersebut di antara manusia, hewan dan lingkungan. Hal tersebut merupakan ancaman utama bagi kesehatan masyarakat karena terkait dengan menurunnya efektivitas antibiotik yang mengarah pada peningkatan morbiditas, mortalitas dan tingginya beban biaya kesehatan.<sup>32</sup> *Escherichia.coli* dan *ESBL-E.coli* yang terkonfirmasi hasil isolasi menggunakan *TBX Agar* dengan suplementasi *Cefotaxime* yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan kisaran performa *chromogenic* medium lainnya yang digunakan dalam deteksi bakteri penghasil *ESBL-E.coli*. Beberapa referensi penelitian menunjukkan kisaran performa *chromogenic* medium sebesar 63-88 persen.<sup>33-35</sup> Oleh karena itu, *TBX Agar* dengan suplementasi *Cefotaxime* dapat digunakan sebagai alternatif medium untuk

skrining *ESBL-E.coli* dari sampel lingkungan. Nilai minimum dan maksimum yang diperoleh tergolong cukup tinggi. *TBX Agar* dengan suplementasi *Cefotaxime* dapat mendeteksi minimal 12% *ESBL-E.coli*, namun dalam penggunaannya tetap diperlukan konfirmasi spesies dan *ESBL-E.coli* menggunakan uji biokimia sederhana yaitu indol dan uji konfirmasi *ESBL* dengan menggunakan *double-disk test*.

## KESIMPULAN

Medium *TBX+Cefotaxime* dapat digunakan untuk skrining *E.coli* dan *ESBL-E.coli* pada sampel lingkungan. Sesuai hasil yang diperoleh, medium ini dapat digunakan untuk identifikasi *presumptive E.coli* dengan tingkat akurasi 40-100%. Namun, untuk identifikasi *ESBL-E.coli*, akurasi bervariasi antara 12-100%. Saran untuk penelitian atau pemeriksaan serupa agar melakukan konfirmasi lanjut menggunakan uji indol dan *double-disk test*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, dan Puslitbang Kualitas dan Laboratorium Lingkungan, khususnya kepada Nabilah Aini dan Andriantoro atas dukungannya dalam pelaksanaan penelitian. Terima kasih juga disampaikan kepada seluruh pihak yang berperan dalam studi ini.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Cormican M. Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. 2010;76(14):4772-4779. doi:10.1128/AEM.02898-09.
2. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 9000 Microbiological Examination Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*; 1999.

3. Gao L, Hu J, Zhang X, et al. Dissemination of ESBL-producing *Escherichia coli* of chicken origin to the nearby river water. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2014;24(4):279-285. doi:10.1159/000365786.
4. Aruna S, Rao BN, Rao N. Faecal Carriage of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* among Patients, Healthy Individuals and in Environment from a South Indian Tertiary Care Hospital. 2018;7:332-338.
5. Gao LL, Tan Y, Zhang XD, et al. Emissions of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase resistance from pig farms to the surrounding environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(4):4203-4213. doi:10.3390/ijerph120404203.
6. Sudarwanto MB, Lukman DW, Purnawarman T, Latif H, Pisestyani H, Sukmawinata E. Multidrug Resistance Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC Producing *Escherichia coli* Isolated from The Environment of Bogor Slaughterhouse, Indonesia. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2017;7(8):708-711. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.012.
7. Kuralayanapalya SP, Patil SS, Hamsapriya S, Shinduja R, Roy P, Amachawadi RG. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria from animal origin: A systematic review and meta-analysis report from India. *PLoS One*. 2019;14(9):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0221771.
8. Liu H, Zhou H, Li Q, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):1-12. doi:10.1186/s12866-018-1270-0.
9. Silva V, Peixoto F, Parelho C, et al. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in soils subjected to livestock grazing in Azores archipelago: an environment-health pollution issue? *Int Microbiol*. Published online 2020. doi:10.1007/s10123-020-00134-0.
10. Ur Rahman S, Ahmad S, Khan I. Incidence of ESBL-producing-*Escherichia coli* in poultry farm environment and retail poultry meat. *Pak Vet J*. 2019;39(1):116-120. doi:10.29261/pakvetj/2018.091.
11. Sudarwanto MB, Lukman DW, Purnawarman T, Latif H, Pisestyani H, Sukmawinata E. Multidrug Resistance Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC Producing *Escherichia coli* Isolated from The Environment of Bogor Slaughterhouse, Indonesia. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2017;7(8):708-711. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.012.
12. Boron AL. Antimicrobial Resistance and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Escherichia coli* from Major Rivers in Podhale, Southern Poland. Published online 2017.
13. Mahato S, Mahato A, Pokharel E, Tamrakar A. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. in Effluents of Different Hospitals Sewage in Biratnagar, Nepal. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):4-9. doi:10.1186/s13104-019-4689-y
14. Ramteke PW, Tewari S. Media for Specific Detection of Environmental. *Environ Monit Assess*. Published online 2001:121-127.
15. Koltun A. Evaluation of Six Chromogenic Diagnostic Culture Media for A One Health ESBL *E. coli* Indicator System for Global AMR Surveillance. Published online 2018:145.
16. World Health Organization. *WHO Integrated Global Survey on ESBL-Producing E. Coli Using A One Health Approach : The Tricycle Project*. Protocol V. Geneva : World Health Organization; 2017.
17. World Health Organization. Annex 3. Working Package 3 Environment ESBL *E. coli* in Water and Waste Water : Microbiology Procedure. Geneva : World Health Organization; 2018.
18. Afrianti Rahayu S, Muhammad Hidayat Gumilar M. Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal Pharmaceutical Science and Technology*. 2017;4(2):50. doi:10.15416/ijpst.v4i2.13112
19. MacWilliams MP. Indole Test Protocol. *Am J*

- Microbiol.* 2009;(December 2009):1-9.
20. Ezeanya C, Agbakoba N, Ejike C, Okwelogu S. Evaluation of a Chromogenic Medium for the Detection of ESBL with Comparison to Double Disk Synergy Test. *Br J Med Med Res.* 2017;21(12):1-11. doi:10.9734/bjmmr/2017/33259.
  21. Vivant AL, Boutin C, Prost-Boucle S, et al. Free water surface constructed wetlands limit the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in the natural environment. *Water Res.* 2016;104:178-188. doi:10.1016/j.watres.2016.08.015
  22. Vergine P, Salerno C, Barca E, Berardi G, Pollice A. Identification of the faecal indicator *Escherichia coli* in wastewater through the  $\beta$ -D-glucuronidase activity: Comparison between two enumeration methods, membrane filtration with TBX agar, and Colilert®-18. *J Water Health.* 2017;15(2):209-217. doi:10.2166/wh.2016.119.
  23. Akter ML, Haque R, Salam MA. Comparative Evaluation of Chromogenic Agar Medium and Conventional Culture System for Isolation and Presumptive Identification of Uropathogens. *Pakistan J Med Sci.* 2014;30(5):1033-1038. doi:10.12669/pjms.305.5243.
  24. Giamarellou H. Multidrug Resistance in Gram-Positive Bacterial that Produce Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect Suppl.* 2005;11(4):1-16. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01160.x.
  25. Biutifasari V. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL). 2018;1(1):1-11.
  26. Pietsch M, Eller C, Wendt C, et al. Molecular Characterisation of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Hospital and Ambulatory Patients in Germany. *Vet Microbiol.* 2017;200:130-137. doi:10.1016/j.vetmic.2015.11.028.
  27. Hasman H, Agersø Y, Cavaco LM, et al. Laboratory Protocol Validation of Selective MacConkey Agar Plates Supplemented with 1 mg/L Cefotaxime for Monitoring of ESBL- and AmpC-producing *E. coli* in Meat and Caecal Samples. 2017;(November).
  28. Hasman H, Agersø Y, Cavaco LM, Food DTU. Validation of Selective MacConkey Agar Plates Supplemented with 1 mg/L Cefotaxime for Monitoring of ESBL and AmpC Producing *E. coli* in Meat and Animals. 2015;(November).
  29. Harwalkar A, Sataraddi J, Gupta S, Yoganand R, Rao A, Srinivasa H. The Detection of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Patients with Symptomatic Urinary Tract Infections using Different Diffusion Methods in a Rural Setting. *J Infect Public Health.* 2013;6(2):108-114. doi:10.1016/j.jiph.2012.10.004
  30. Verhaegen B, De Reu K, Heyndrickx M, De Zutter L. Comparison of Six Chromogenic Agar Media for The Isolation of a Broad Variety of Non-O157 Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Serogroups. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(6):6965-6978. doi:10.3390/ijerph120606965
  31. Jozić S, Vukić Lušić D, Aljinović A, et al. Is TBX Agar a Suitable Medium for Monitoring *Escherichia coli* in Bathing Water Using The Membrane Filtration Method? *Environ Monit Assess.* 2019;191(9). doi:10.1007/s10661-019-7733-4
  32. Amaya E, Reyes D, Paniagua M, et al. High Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* in Hospital Wastewater in Nicaragua. Published online 2009:2009.
  33. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y. Evaluation of brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2091-2096. doi:10.1128/JCM.02342-09
  34. Réglie-Poupet H, Naas T, Carrer A, et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Med Microbiol.* 2008;57(3):310-315. doi:10.1099/jmm.0.47625-0

35. Blane B, Brodrick HJ, Gouliouris T, et al. Comparison of 2 chromogenic media for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae stool carriage in nursing home residents. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 2016;84(3):181-183. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.008