

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamu beras kencur yang diambil secara acak di kota Surakarta Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamu beras kencur.

#### **B. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental deskriptif yaitu mendeskripsikan AKK dan ALT serta identifikasi bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* pada sediaan jamu beras kencur yang diambil secara acak di kota Surakarta Jawa Tengah.

#### **C. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas: jamu beras kencur yang ada dipasaran dan waktu pengambilan jamu.
2. Variabel tergantung : nilai AKK dan ALT serta identifikasi bakteri
3. Variabel terkontrol : suhu inkubasi 37°C untuk uji ALT dan 25°C untuk uji AKK, waktu inkubasi 24 jam untuk uji ALT dan inkubasi selama 5 hari untuk uji AKK, media untuk AKK yaitu PDA (*Potato Dextrose Agar*), untuk media ALT yaitu NA (*Nutrien Agar*), media yang digunakan, media selektif yaitu media *E. coli* media EA (*Endo Agar*), media untuk *S. aureus* yaitu VJA (*Vogel Johnson Agar*), media untuk *P. aeruginosa* yaitu PSA (*Pseudo Selective Agar*) dan media untuk *Salmonella spp.* yaitu SSA (*Salmonella Shigella Agar*)
4. Variable tak terkontrol : kualitas bahan baku yang digunakan untuk membuat jamu beras kencur.

#### D. Definisi Operasional Variabel

1. Jamu beras kencur adalah jamu beras kencur dalam bentuk cairan yang diramu dan dijual dengan wadah botol plastik atau plastik yang diambil secara acak di kota Surakarta Jawa Tengah.
2. Uji AKK adalah suatu uji cemaran mikroba yang dilakukan dengan menghitung jumlah koloni kapang khamir yang terdapat dalam sampel yang diperiksa setelah cuplikan diinokulasi pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan analisis hasil sesuai dengan PPOMN 2006.
3. Uji ALT suatu metode untuk mengetahui jumlah cemaran mikroba yang dilakukan dengan menghitung jumlah bakteri aerob mesofil yang terdapat dalam jamu beras kencur. Media yang digunakan dalam uji ALT adalah *Nutrien Agar (NA)* dan analisis hasil sesuai dengan BPOMN 2011.
4. Uji identifikasi *E. coli* adalah serangkaian uji untuk mengidentifikasi bakteri *E. coli* yang terdapat pada jamu beras kencur, sehingga dapat diketahui ada atau tidaknya keberadaan *E. coli* pada jamu beras kencur. Serangkaian uji identifikasi *E. coli* tersebut mengacu pada metode Analisis Mikrobiologi Tahun 2006 (MA PPOMN nomor 96/mik/00).
5. Uji identifikasi *S. aureus* adalah uji untuk melihat keberadaan *S. aureus* pada sampel yang diperiksa menggunakan media selektif VJA dan pengamatan koloni dapat dilakukan dengan mengamati adanya koloni cembung warna kuning dan media berubah menjadi jernih (BPOM RI 2008).
6. Uji identifikasi *Salmonella spp.* merupakan serangkaian uji untuk mengidentifikasi *Salmonella spp.* yang terdapat dalam jamu beras kencur dengan melihat ada tidaknya *Salmonella spp.* Pada media selektif, media identifikasi, dan tahap identifikasi menggunakan uji biokimia dengan Metode Analisis Mikrobiologi Tahun 2006 (MA PPOMN nomor 94/mik/00).
7. Uji identifikasi *P. aeruginosa* adalah uji untuk melihat keberadaan *P. aeruginosa* yang terdapat dalam jamu beras kencur yang diperiksa menggunakan media PSA dan pengamatan koloni dapat dilakukan dengan mengamati adanya koloni dengan ciri-ciri koloni berwarna kehijauan dengan Metode Analisis Mikrobiologi Tahun 2006 (MA PPOMN nomor 94/mik/00).

## **E. Alat dan Bahan Penelitian**

### **1. Bahan**

Sampel beras kencur yang diperoleh dari penjual jamu yang diambil secara acak di kota Surakarta Jawa Tengah. Media yang digunakan untuk AKK adalah media *Potato Dextrose Agar (PDA)*. Media yang digunakan untuk ALT adalah *Nutrien Agar (NA)*, media untuk *E.coli* yaitu *endo agar (EA)*, media *S.aureus* yaitu VJA, media *P. aureus* yaitu PSA, media untuk *Salmonella spp.* yaitu SSA. Kloramfenikol (Brataco Chemika), Cairan NaCl, aquadest steril, etanol 70%.

### **2. Alat**

*Laminar Air Flow* (NuAire Airflow), autoklaf, inkubator, oven, mikropipet, mikroskop, pipet tetes, tabung reaksi, gelas sediaan, cawan petri (100 x 15 mm), pipet volume, Beaker glass, gelas ukur, Bunsen, neraca analitik, Erlenmeyer, penangas air, jarum ose, batang pengaduk.

## **F. Jalan Penelitian**

### **1. Pemilihan sampel**

Sampel jamu beras kencur yang dipilih dari beberapa penjual jamu yang diambil secara acak di kota Surakarta. Pengambilan sampel jamu hanya dilakukan satu kali pengambilan dengan masing-masing penjual diambil 1 botol sampel, sehingga total jumlah sampel jamu yang didapat sebanyak 5 sampel. Pengambilan sampel dilakukan jam 07.00 pagi. Sampel jamu beras kencur dipindahkan dalam botol steril. Penggunaan botol steril dimaksudkan untuk mengurangi cemaran mikroba yang mungkin bisa berasal dari jamu itu sendiri atau berasal dari luar. Botol steril yang dimaksud adalah botol terbuat dari kaca yang sudah disterilisasi menggunakan autoklaf. Tujuan dari penggunaan *cool box* adalah untuk menghindari cemaran dari luar jamu dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen saat proses membawa sampel jamu tersebut ke laboratorium sehingga diharapkan hasil yang diperoleh (AKK dan ALT) dapat benar-benar menggambarkan cemaran yang didapat dari tempat pengambilan sampel. Kapang

dan khamir dapat tumbuh optimum pada suhu 25°C, sedangkan bakteri aerob mesofil tumbuh optimum pada suhu 37°C (Cappucino 2008).

## **2. Sterilisasi alat**

Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dan dikeringkan. Tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, dan pipet ditutup mulutnya dengan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas. Cawan petri dibungkus terpisah dengan kertas, kemudian semua alat disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

## **3. Homogenisasi sampel**

Homogenisasi sampel merupakan tahap yang harus dilakukan pada sampel supaya diperoleh distribusi mikroba yang merata di dalam sampel sehingga mudah untuk diamati (Radji 2010). Tujuan homogenisasi sampel adalah untuk membebaskan sel-sel bakteri atau jamur yang masih terlindungi oleh partikel dari sampel yang akan diperiksa. Proses homogenisasi dilakukan dengan cara aseptis, yaitu mengambil 25 ml jamu beras kencur yang sudah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril kemudian ditambahkan 225 ml larutan pengencer infus NaCl sehingga diperoleh pengenceran 1:10 ( $10^{-1}$ ).

## **4. Pengenceran sampel**

Proses pengenceran dilakukan dengan cara menyiapkan tabung reaksi sebanyak 10 buah (4 untuk pengujian AKK dan 6 untuk pengujian ALT) dan diisi dengan 9 ml cairan NaCl. Satu mililiter pengenceran  $10^{-1}$  dari hasil homogenisasi pada penyiapan sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung pertama yang telah berisi infus NaCl hingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$  dan dikocok sampai homogen dan vortex. Kemudian dibuat pengenceran sampai  $10^{-6}$  untuk pengujian ALT dan  $10^{-4}$  untuk AKK.

## **5. Uji Angka Kapang Khamir**

Diambil 1 ml pada pengenceran  $10^{-1}$  sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Cawan petri diisi dengan media PDA 20 ml dan ditambahkan kloramfenikol diamkan sampai memadat, setelah itu diinkubasi selama 5 hari dengan suhu 25°C. Pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-3}$  dilakukan serupa. Media PDA juga ditambahkan antibiotik kloramfenikol yang bertujuan untuk menghambat

pertumbuhan bakteri pada media sehingga yang tumbuh pada media hanya kapang khamir.

#### **6. Uji Angka Lempeng Total**

Diambil 1 ml pada pengenceran  $10^{-1}$  sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Cawan petri diisi dengan media NA 15 ml dihomogenkan sampai memadat, setelah itu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-4}$  dilakukan serupa.

#### **7. Uji Identifikasi *Escherichia coli***

Pengujian *E. coli* dengan cara diambil 1 ml pada pengenceran  $10^{-1}$ , kemudian masukkan ke dalam cawan petri, dan dituangi media EA dibiarkan sampai memadat, setelah itu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Hasil positif *E. coli* adanya kilat logam pada media.

#### **8. Uji Identifikasi *S.aureus***

Pengujian *S.aureus* dengan cara diambil 1 ml pada pengenceran  $10^{-1}$ , kemudian masukkan ke dalam cawan petri, dan dituangi media VJA yang telah ditambah kalium telurit sebagai pemberi pigmen hitam dan untuk mencegah pertumbuhan bakteri lain yang tumbuh. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Hasil positif *S. aureus* dengan koloni hitam dan zona sekeliling kuning.

#### **9. Uji Identifikasi *Salmonella spp.***

Pengujian *Salmonella spp.* dilakukan dengan mengambil 1 ml pada pengenceran  $10^{-1}$ , kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan media SSA dibiarkan sampai memadat. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Hasil positif dengan koloni coklat ke abu-abu sampai hitam.

#### **10. Uji Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa***

Pengujian *P. aeruginosa* dilakukan dengan mengambil 1 ml pada pengenceran  $10^{-1}$ , kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan media PSA dibiarkan sampai memadat. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Dikatakan positif jika koloni berwarna hijau kebiru-biruan (Jawetz et al. 2012).

## G. Analisis Hasil

### 1. Uji Angka Kapang Khamir

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai dengan PPOMN (2006), yaitu : cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 dari satu pengenceran dipilih dan dihitung jumlah koloni dan dihitung jumlah koloni dari kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dikalikan sebagai Angka Kapang Khamir dalam tiap gram atau mL sampel.

Untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut :

- a. Bila hanya salah satu di antara kedua cawan petri dari pengenceran yang sama menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- b. Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran di bawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (Misal: pada pengenceran  $10^{-2}$  diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran  $10^{-3}$  diperoleh 30 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada pengenceran  $10^{-2}$  yaitu 60 koloni). Bila pada pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni kurang dari dua kali jumlah koloni pengenceran di bawahnya, maka diambil angka rata-rata dari jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Hasil dinyatakan sebagai Angka Kapang Khamir dalam tiap gram sampel (Misal pada pengenceran  $10^{-2}$  diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran  $10^{-3}$  diperoleh 10 koloni, maka Angka Kapang Khamir adalah :

$$\frac{6+10}{2} \times 10^3 = 8 \times 10^3$$

- c. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang Khamir Perkiraan.

- d. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Kapang Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah ( $<1 \times$  faktor pengenceran terendah).

## 2. Uji Angka Lempeng Total

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai dengan BPOMN (2011) yaitu:

- a. Cara perhitungan untuk Angka Lempeng Total

Jumlah  $N$  mikroba yang ada di dalam contoh dihitung dengan menggunakan:

$$N = m / (V \times d) \dots \dots (1)$$

$$N = c / (V \times d) \dots \dots (2)$$

$$N = x_c / (V \times d) \dots \dots (3)$$

dimana :

$m$  : rata-rata hitungan yang diperoleh dari pengamatan duplo.

$V$  : jumlah volume inokulum yang dipindahkan ke masing-masing cawan Petri, dalam satuan mililiter.

$d$  : faktor pengenceran dari pengenceran yang dibuat untuk preparasi suspensi awal atau pengenceran pertama.

$C$  : jumlah koloni yang terhitung pada Petri tunggal  $\times c$  adalah rata-rata hitungan yang diperoleh dari dua pengenceran yang berturut-turut, dan dihitung sebagai berikut :

$$x_c = \frac{\sum c}{n_1 + 0,1 n_2}$$

dimana:

$\sum c$  : jumlah koloni terhitung pada semua cawan petri yang diperoleh dari dua pengenceran berturut-turut.

$n_1$  : jumlah yang terhitung pada cawan Petri untuk suspensi awal (atau untuk pengenceran pertama)

$n_2$  : jumlah yang terhitung pada cawan Petri untuk 1/10 dari suspensi awal (atau untuk pengenceran kedua).

Hasil dibulatkan dalam 2 angka. Jika angka terakhir adalah di bawah 5, angka sebelumnya tidak diubah; jika angka terakhir adalah 5 atau lebih, angka

sebelumnya dinaikkan satu unit. Teruskan sampai diperoleh 2 angka yang signifikan. Catat jumlah N yang didapat.

b. Interpretasi

Keragaman sifat dari perhitungan lempeng diambil untuk penghitungan. Dua hasil dapat dianggap berbeda jika selisihnya melebihi 50 % atau ketika dinyatakan dalam logaritma, selisihnya melebihi 0,3. Untuk penghitungan yang tepat, hanya cawan Petri dengan koloni lebih dari 30 dan kurang dari 300 untuk penghitungan cara tuang dan sebar permukaan. Untuk penghitungan cara penyaringan membran, hanya membran dengan koloni lebih dari 15 dan kurang dari 150.

- c. Jika jumlah koloni lebih dari 30 dan kurang dari 300 pada cawan petri, atau lebih dari 15 dan kurang dari 150 pada membran, dimana  $S$  adalah massa atau volume contoh, hasil dinyatakan sebagai berikut :

Jika  $S$  adalah sedikitnya 1 g atau 1 mL,  $V$  sedikitnya 1 mL

Jumlah bakteri aerob mesofil per mL atau per gram contoh adalah

$$= N/S$$

Jika  $S < 1$  g atau 1 mL, dan atau  $V < 1$  mL

Jumlah bakteri aerob mesofil per mL atau per gram contoh adalah

$$= N \text{ (jumlah contoh yang diambil untuk penghitungan } S \text{ dan } V \text{ harus dicatat)}$$

Nyatakan hasil sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan 10 pangkat

- d. Jika jumlah koloni kurang dari 30 pada cawan petri atau 15 pada membran, hasil dinyatakan sebagai berikut:

Jika  $S$  paling sedikit 1 g atau 1 mL, dan  $V$  paling sedikit 1 mL;

Jumlah perkiraan bakteri per mL atau per g contoh adalah  $N/S$

Jika  $S < 1$  g atau 1 mL, dan atau  $V < 1$  mL;

Bakteri per mL atau per g contoh adalah  $N$ .

Hasil dinyatakan sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan faktor pengenceran ( misal 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> dst)

- e. Jika **tidak ada koloni** yang diamati, hasilnya dilaporkan sebagai berikut :

Kurang dari  $1/(d \times V \times S)$  dari bakteri per mL atau per g produk ( $S$  minimal 1 g atau 1 mL);



Kurang dari  $1/(d \times V)$  dari bakteri pada contoh S (jumlah contoh yang diambil harus dicatat dan dimasukkan ke dalam penghitungan S dan V, serta S kurang dari 1 g atau 1 mL) dimana d adalah faktor pengenceran dari suspensi awal dan V adalah 1 (untuk penghitungan dengan cara tuang dan cara penyaringan membran) atau 0,1 (untuk cara sebar permukaan).

f. Contoh penghitungan

**Contoh 1.** Dua cawan Petri untuk satu pengenceran

S = 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 38 dan 42 maka rataannya adalah 40, menggunakan persamaan 1.

$N = m/(V \times d) = 40 / (1 \times 10^{-1}) = 40 / 0,1 = 400 = 4 \times 10^2$  cfu bakteri per g atau mL contoh

**Contoh 2.** Satu cawan Petri untuk satu pengenceran S = 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 60 menggunakan persamaan 2.

$N = c / (V \times d) = 60 / (1 \times 10^{-1}) = 60 / 0,1 = 600 = 6 \times 10^2$  cfu bakteri per gram atau mililiter contoh.

**Contoh 3.** Dua cawan Petri untuk dua pengenceran

S = 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni pada pengenceran  $10^{-2}$  adalah 235 dan 282, pada pengenceran  $10^{-3}$  adalah 31 dan 39, menggunakan persamaan 3.

$N = \sum xc / (V \times d) = (235 + 282 + 31 + 39) / [1 (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}] = 587 / 0,022 = 26682$

Hasil di atas dibulatkan menjadi 27000 atau  $2,7 \times 10^4$  cfu bakteri per mL atau per g contoh.

**Contoh 4.** Dua membran penyaring untuk satu pengenceran

S = 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 18 dan 22 maka rataannya adalah 20, menggunakan persamaan 1.

$N = m / (V \times d) = 20 / (1 \times 10^{-1}) = 20 / 0,1 = 200 = 2 \times 10^2$  cfu bakteri per g atau mL contoh.

**Contoh 5.** Satu membran penyaring untuk satu pengenceran

S = 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 65, menggunakan persamaan 2.

$N = c / (V \times d) = 65 / (1 \times 10^{-1}) = 65 / 0,1 = 650 = 6,5 \times 10^2$  cfu bakteri per g atau mL contoh.

**Contoh 6.** Dua membran penyaring untuk dua pengenceran

$S = 1$  g atau 1 mL;  $V = 1$  mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 121 dan 105, pengenceran  $10^{-2}$  adalah 15 dan 25, menggunakan persamaan 3.

$$N = \sum c / (V \times d) = (121 + 105 + 15 + 25) / [1 (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}] = 266 / 0,022 = 1209$$

Hasil di atas dibulatkan menjadi 1200 atau  $1,2 \times 10^3$  cfu bakteri per mL atau per gram contoh.

**Contoh 7.** Dua cawan Petri untuk satu pengenceran

$S = 1$  g atau 1 mL;  $V = 1$  mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 28 dan 22 maka rataannya adalah 25, menggunakan persamaan 1.

$$N = m / (V \times d) = 25 / (1 \times 10^{-1}) = 25 / 0,1 = 250$$

**Jumlah perkiraan** adalah 250 atau  $2,5 \times 10^2$  cfu bakteri per g atau mL contoh.

**Contoh 8.**

$S = 1$  g atau 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 0 dan 0, menggunakan persamaan 1

$$\begin{aligned} N &\leq 1 / (V \times d) \\ &\leq 1 / (1 \times 10^{-1}) \\ &\leq 1 / 0,1 \\ &\leq 10 \end{aligned}$$

**Jumlah perkiraan** adalah  $\leq 10$  cfu bakteri per g atau mL contoh.

**Contoh 9.**

$S = 1$  g atau 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran  $10^{-1}$  adalah 0 dan 3 maka rataannya adalah 1,5 menggunakan persamaan 1

$$\begin{aligned} N &\leq m / (V \times d) \\ &\leq 1,5 / (1 \times 10^{-1}) \\ &\leq 1,5 / 0,1 \\ &\leq 15 \end{aligned}$$

**Jumlah perkiraan** adalah  $\leq 15$  cfu bakteri aerob mesofil per g atau mL sampel.

**3. Identifikasi *E. coli***

*E. coli* adalah bakteri gram negatif dan berbentuk batang. Identifikasi bakteri dilakukan pada media EA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif dengan adanya logam kilat.

**4. Identifikasi *S. aureus***

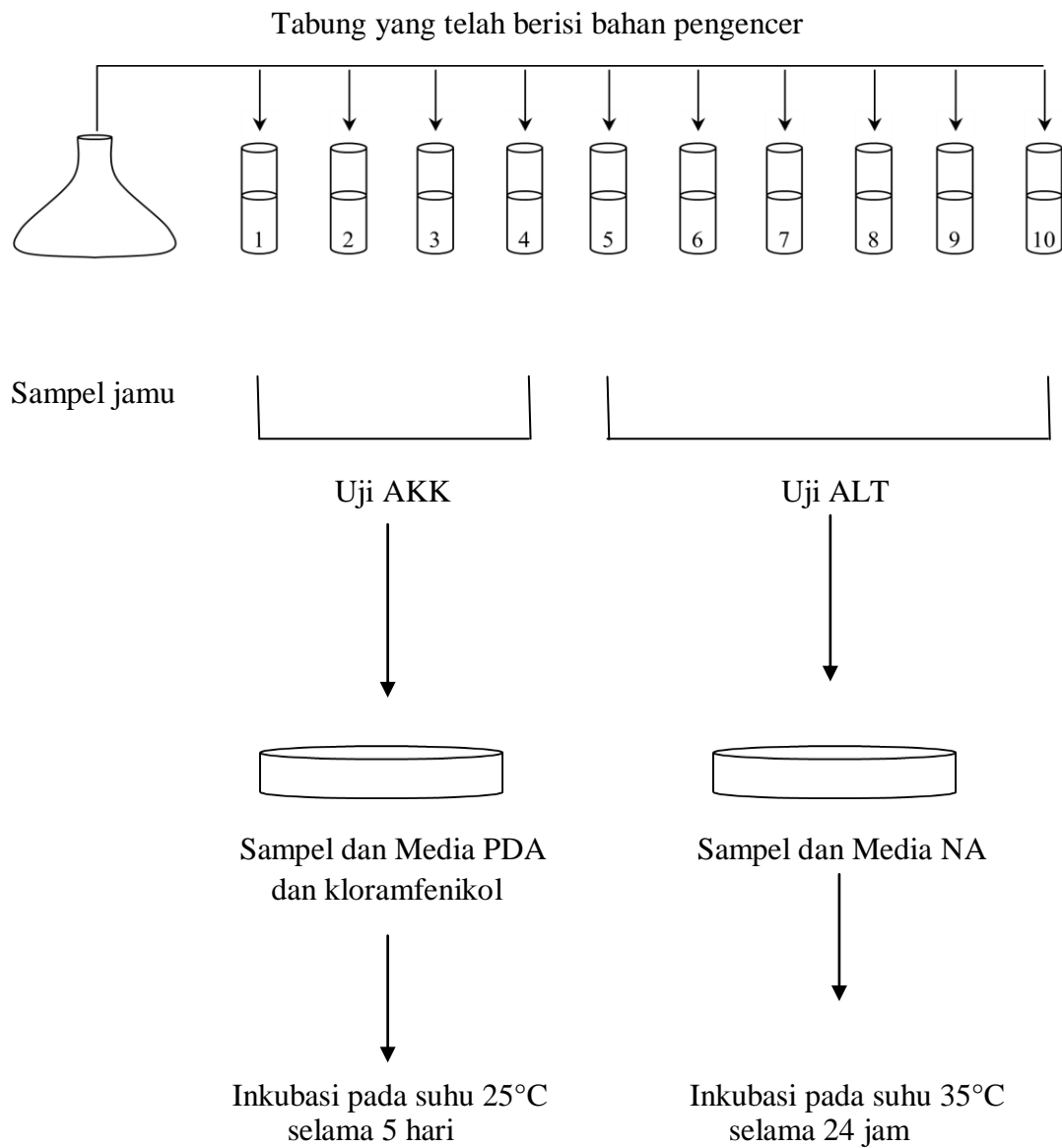
*S. aureus* adalah bakteri gram positif. Identifikasi bakteri dilakukan pada media VJA pada suhu 37°C selama 24 jam. Dengan cara mengamati adanya koloni cembung warna kuning yang menyebabkan media berubah menjadi jernih.

**5. Identifikasi *Salmonella spp.***

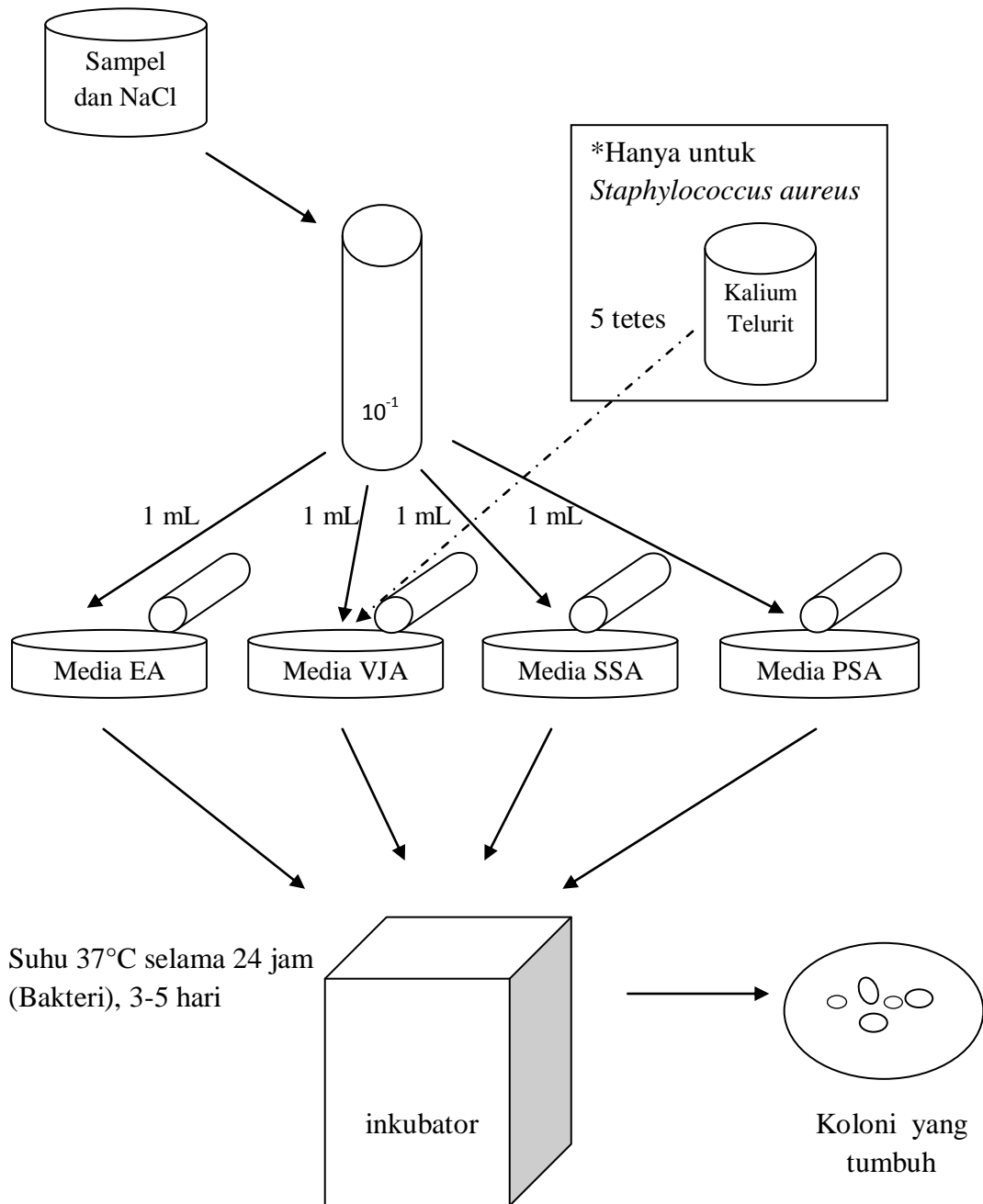
*Salmonella spp.* adalah bakteri gram negatif yang berbentuk batang. Identifikasi bakteri dilakukan pada media SSA pada suhu 37°C suhu 24 jam. Dengan mengamati ciri-ciri koloni coklat ke abu-abu sampai hitam.

**6. Identifikasi *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang dan identifikasi bakteri dilakukan pada media PSA pada suhu 37°C selama 24 jam. Dengan mengamati pertumbuhan koloni berwarna kehijauan.



**Gambar 1. Uji AKK dan ALT**



Gambar 2. Skema pengerjaan *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*