

**Metode uji standar untuk evaluasi formulasi  
*handwash* dan *handrub* higienis untuk aktivitas  
eliminasi virus menggunakan seluruh tangan**

**Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash  
and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity  
Using the Entire Hand**

(ASTM E2011-21, IDT)



## Daftar isi

|   |    |
|---|----|
| Daftar isi .....  | i  |
| Prakata .....   | ii |
| Pendahuluan .....   | iv |
| 1 Ruang Lingkup.....  | 2  |
| 2 Acuan normatif.....   | 2  |
| 3 Istilah dan definisi .....  | 4  |
| 4 Metode uji .....  | 4  |
| 5 Signifikasi dan penggunaan .....  | 6  |
| 6 Peralatan dan Perlengkapan.....   | 8  |
| 7 Bahan dan Reagen .....  | 10 |
| 8 Uji Virus dan kultur sel .....  | 12 |
| 9 Penyiapan stok virus dan determinasi titer infeksi .....                                | 12 |
| 10 Kontrol .....  | 14 |
| 11 Pembersihan dan dekontaminasi tangan sebelum percobaan kontaminasi.....                | 16 |
| 12 Prosedur untuk kontaminasi Viral pada tangan dan aplikasi dari uji zat/ cairan kontrol | 16 |
| 13 Kalkulasi dari reduksi dalam infektivitas virus.....                                   | 18 |
| 14 Presisi dan bias.....  | 20 |
| 15 Kata kunci.....  | 20 |
| Lampiran_(Informasi tidak wajib) .....  | 22 |
| X1 Virus dan sel inang direkomendasikan untuk digunakan pada protokol uji .....           | 22 |
| X2 Metode Pemulihan Viral Alternatif dalam Protokol Uji .....                             | 22 |
| Bibliografi.....  | 24 |

## Prakata

SNI 8894:2024, *Metode uji standar untuk evaluasi formulasi handwash dan handrub higienis untuk kegiatan eliminasi virus menggunakan seluruh tangan*, merupakan standar revisi dari SNI 8894:2020, *Metode uji standar untuk evaluasi formulasi handwash dan handrub higienis untuk kegiatan eliminasi virus menggunakan seluruh tangan*. Standar ini disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ASTM E2011-21, *Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand*, dengan metode adopsi identik terjemahan dua Bahasa dan ditetapkan oleh BSN pada tahun 2024.

Standar ini menggantikan SNI 8894:2020, *Metode uji standar untuk evaluasi formulasi handwash dan handrub higienis untuk kegiatan eliminasi virus menggunakan seluruh tangan*, yang disusun dengan metode adopsi republication-reprint dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2020.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 11-11, Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 29 April 2024 di Jakarta melalui telekonferensi, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal **14 Juni 2024 sampai dengan 28 Juni 2024** dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Terdapat standar yang menjadi acuan normatif dalam standar ini telah diadopsi menjadi SNI yaitu:

- ASTM E1838 – 17, *Standard Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults*, telah diadopsi secara identik menjadi SNI 8893:2024, *Metode uji standar untuk menentukan efektivitas eliminasi virus dari agen handwash dan handrub higienis menggunakan ujung jari orang dewasa (ASTM E1838 - 17, IDT)*

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya, yaitu ASTM E2011-21, dan/atau dokumen terkait lain yang menyertainya.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.



**“Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.”**



## Pendahuluan

Penghilangan dan/atau inaktivasi virus in situ secara mekanis dengan agen (*agents*) *handwash* dan *handrub* higienis dapat dinilai dengan menggunakan tangan orang dewasa yang telah dikontaminasi secara artifisial. Metode pengujian ini menggunakan seluruh permukaan kedua tangan (termasuk kedua permukaan bagian dalam dan bagian luar tangan) berbeda dengan hanya menggunakan ujung jari seperti yang dijelaskan dalam prosedur Metode Uji E1838. Namun, hasil laporan dari dua metode pengujian tersebut sebanding. (**1**, **2**)<sup>1)</sup>

---

<sup>1)</sup> Angka yang dicetak tebal dalam tanda kurung mengacu pada daftar referensi di akhir metode pengujian ini.



## INTRODUCTION

Mechanical removal and/or in situ inactivation of viruses by hygienic handwash and handrub agents can be assessed using artificially-contaminated hands of adults. This test method uses the entire surface of both hands (including both the palmar and dorsum sides of the hands) in contrast to only the fingerpads in the procedure described in Test Method E1838. However, the reported results from these two methods are comparable. (1, 2)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> The boldface numbers in parentheses refer to a list of references at the end of this test method.







**“Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.”**

## Metode uji standar untuk evaluasi formulasi *handwash* dan *handrub* higienis untuk kegiatan eliminasi virus menggunakan seluruh tangan<sup>2</sup>

### 1 Ruang Lingkup

**1.1** Standar ini menetapkan standar evaluasi agen *handwash* dan *handrub* yang mempunyai kemampuan untuk mengurangi atau mengeliminasi virus pada kulit tangan manusia.

**CATATAN** Metode pengujian ini mempersyaratkan pengetahuan teknik virologi

**1.2** Nilai-nilai yang dinyatakan dalam satuan SI dianggap sebagai standar. Tidak ada satuan pengukuran lain yang digunakan dalam standar ini.

**1.3** Standar ini mungkin melibatkan bahan berbahaya, pengoperasian dan peralatan. Standar ini tidak ditujukan untuk menangani semua masalah terkait keamanan yang berhubungan dengan penggunaannya. Pengguna standar ini bertanggung jawab untuk menetapkan praktik keselamatan dan kesehatan yang sesuai dan menentukan batasan regulasi yang dapat diterapkan sebelum digunakan. Pengguna sebaiknya berkonsultasi terkait referensi untuk rekomendasi keamanan laboratorium. (3-5)

**1.4** Standar ini dikembangkan sesuai dengan prinsip-prinsip yang diakui secara internasional tentang standardisasi yang ditetapkan, dalam prinsip Pengembangan Standar Internasional, Panduan dan Rekomendasi yang dikeluarkan oleh Komite Hambatan Teknis Perdagangan Organisasi Perdagangan Dunia (*World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee*).

### 2 Acuan normatif

#### 2.1 Standar ASTM:<sup>3</sup>

E1482, *Practice for Use of Gel Filtration Columns for Cytotoxicity Reduction and Neutralization*

E1838, *Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults*

E2756, *Terminology Relating to Antimicrobial and Antiviral Agents*

#### 2.2 AOAC Standard:

#### 2.2 AOAC Standard:

AOAC 960.9, *Official Methods of Analysis (2007)*<sup>4</sup>

---

<sup>2</sup> Metode pengujian ini berada di bawah yurisdiksi Komite ASTM E35 pada Pestisida, Antimikroba, dan Agen Pengendali Alternatif dan merupakan pihak langsung tanggung jawab Subkomite E35.15 tentang Agen Antimikroba.

Edisi saat ini disetujui 1 April 2021. Diterbitkan Juni 2021. Aslinya disetujui pada tahun 1999. Edisi terakhir sebelumnya disetujui pada tahun 2013 sebagai E2011 – 13. DOI:10.1520/E2011-21.

<sup>3</sup> Untuk referensi standar ASTM, kunjungi situs web ASTM, [www.astm.org](http://www.astm.org), atau hubungi Layanan Pelanggan ASTM di [service@astm.org](mailto:service@astm.org). Untuk Buku Tahunan ASTM Informasi volume standar, lihat halaman Ringkasan Dokumen standar di situs web ASTM.

<sup>4</sup> Tersedia dari AOAC International, 481 North Frederick Ave., Suite 500, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, <http://www.aoac.org>.

## Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand<sup>2</sup>

### 1. Scope

**1.1** This test method is designed to evaluate handwash or handrub agents for their ability to reduce or eliminate viable viruses from the skin of human hands.

**NOTE 1**—A knowledge of virological techniques is required for this test method.

**1.2** The values stated in SI units are to be regarded as standard. No other units of measurement are included in this standard.

**1.3** This standard may involve hazardous materials, operations and equipment. This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety, health, and environmental practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use. The user should consult a reference for laboratory safety recommendations. (3-5)

**1.4** This international standard was developed in accordance with internationally recognized principles on standardization established in the Decision on Principles for the Development of International Standards, Guides and Recommendations issued by the World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee.

### 2. Referenced Documents

#### 2.1 ASTM Standards:<sup>3</sup>

E1482 Practice for Use of Gel Filtration Columns for Cytotoxicity Reduction and Neutralization

E1838 Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults

E2756 Terminology Relating to Antimicrobial and Antiviral Agents

#### 2.2 AOAC Standard:

AOAC 960.9 Official Methods of Analysis (2007)<sup>8</sup>

---

<sup>2</sup> This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee E35 on Pesticides, Antimicrobials, and Alternative Control Agents and is the direct responsibility of Subcommittee E35.15 on Antimicrobial Agents.

Current edition approved April 1, 2021. Published June 2021. Originally approved in 1999. Last previous edition approved in 2013 as E2011 – 13. DOI: 10.1520/E2011-21.

<sup>3</sup> For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, [www.astm.org](http://www.astm.org), or contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org). For Annual Book of ASTM Standards volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website

<sup>4</sup> Available from AOAC International, 481 North Frederick Ave., Suite 500, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, <http://www.aoac.org>.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1 Istilah dan definisi yang digunakan dalam standar ini, mengacu pada standar ASTM E2756.

#### 3.2 Istilah dan definisi spesifik pada standar ini:

**3.2.1 agen *handwash* higienis**, n — agen yang umumnya digunakan mencuci tangan oleh personel di rumah sakit, fasilitas kesehatan lainnya, pusat penitipan anak, panti jompo dan tempat pengolahan makanan; sebaiknya aman untuk penggunaan berulang kali, Tidak menyebabkan iritasi, bereaksi cepat dan efisien dalam meghilangkan mikroorganisme sementara dari kulit.

**3.2.2 agen handrub higienis (*hand sanitizers*)**, n — agen yang tidak memerlukan pembersihan dan umumnya digunakan untuk kebersihan tangan oleh personel di rumah sakit, fasilitas kesehatan lainnya, pusat penitipan anak, panti jompo dan tempat pengolahan makanan; sebaiknya aman untuk penggunaan berulang kali Tidak menyebabkan iritasi, bereaksi cepat dan efisien dalam meghilangkan mikroorganisme sementara dari kulit.

**3.2.3 *sabun non medis***, n — merupakan sabun atau detergen yang lembut untuk kulit dan tidak mengandung bahan kimia germisida

**3.2.4 beban tanah (organik)**, n — larutan satu atau lebih bahan organik dan / atau anorganik yang ditambahkan ke suspensi organisme uji untuk mensimulasikan adanya sekresi tubuh, ekskresi, atau bahan asing lainnya.

**3.2.5 agen eliminasi virus (inaktivasi/menghilangkan)**, n — agen yang membersihkan tangan dari vrus dengan cara menginaktivasi virus di kulit atau dengan cara melepaskan virus untuk kemudian dicuci/dibersihkan.

**3.2.6 agen inaktivasi virus** , n — setiap agen yang tidak menimbulkan penularan virus

### 4 Metode uji

**4.1** Metode uji ini menggunakan subjek orang dewasa yang telah memberikan persetujuan tertulis dan tangan mereka telah dinyatakan bebas dari kerusakan yang jelas pada saat berpartisipasi dalam penelitian.

**4.1.1** Karena kedua tangan, termasuk kuku dari subjek uji terpapar suspensi virus yang tinggi, setiap subjek harus diperiksa dengan hati-hati untuk iritasi kulit, celah mikro, atau luka pada kulit tangan dan sekitar kuku menggunakan kaca pembesar di bawah kondisi pencahayaan yang baik. Mereka yang memiliki kerusakan kulit yang jelas harus tidak berpartisipasi dalam pengujian.

**4.1.2** Meskipun tidak lebih dari enam subjek (satu dievaluasi untuk dasar (*baseline*) dan lima dievaluasi setelah penggunaan produk uji) direkomendasikan untuk setiap kombinasi virus - substansi uji yang akan dievaluasi, jumlah yang diperlukan dapat bervariasi bergantung pada penggunaan data yang dimaksud dan regulasi yang dituju.

### 3. Terminology

3.1 For definitions of terms used in this method refer to Terminology E2756.

3.2 Definitions of Terms Specific to This Standard:

3.2.1 hygienic handwash agents, n—agents generally used for handwashing by personnel in hospitals, other health-care facilities, day-care centers, nursing homes, and food-handling establishments; should be safe for repeated use, non-irritating, fast-acting, and efficient in eliminating transient microorganisms from intact skin.

3.2.2 hygienic handrub agents (that is, hand sanitizers), n—agents not requiring rinsing and generally used for hand hygiene by personnel in hospitals, other health-care facilities, 3. Terminology

3.2.3 non-medicated soap, n—a soap or detergent that is mild to the skin and does not contain any germicidal chemicals.

3.2.4 soil (organic) load, n—a solution of one or more organic and/or inorganic substances added to the suspension of the test organism to simulate the presence of body secretions, excretions or other extraneous substances.

3.2.5 virus-eliminating (inactivating/removing) agent, n—any agent that rids hands of viruses by either inactivating them on the skin or by dislodging them for subsequent wash-off.

3.2.6 virus-inactivating agent, n—any agent that renders a virus noninfectious.

### 4. Summary of Test Method

4.1 This test method uses adult subjects who have provided a written informed consent and whose hands have been determined to be free from any apparent damage at the time of their participation in the study.

4.1.1 Since both hands, including nail beds, of the test subject are exposed to high-titer suspensions of virus, each subject shall be carefully examined for any skin irritations, micro-breaches, or breaks in the hand skin and around the nails using a magnifying glass under well-lighted conditions. Those with any breaches, breaks, or other apparent skin damages shall not participate in the test.

4.1.2 While no fewer than six subjects (one evaluated for baseline and five evaluated post-application of test product) are recommended for each virus-test substance combination to be evaluated, the number required may vary depending on the intended use of the data and the target regulatory agency.

**4.2** Semua subjek sebaiknya tidak menggunakan antimikroba setidaknya satu minggu sebelum kontaminasi eksperimental pada tangan mereka.

**4.3** Suspensi yang dipersiapkan dari virus uji yang dipilih dibiakkan dan diencerkan atau dikonsentrasikan untuk menghasilkan titer dengan minimum  $10^7$  unit infeksi/mL. Virus kontaminasi diaplikasikan ke tangan dan tangan diperlakukan dengan substansi uji sesuai dengan petunjuk produsen atau dengan regimen uji yang ditetapkan.

**4.4** Titer virus yang diperoleh kembali (*recovered*) setelah perlakuan dengan zat uji dibandingkan dengan sampel dasar.

**4.5** Virus pada tangan yang terkontaminasi secara eksperimental terpapar zat uji untuk jangka waktu yang direkomendasikan oleh produsen produk dan mewakili kondisi aktual penggunaan produk. Virus yang akan diperoleh kembali (*recovered*) setelah terpapar zat uji, diuji dalam sistem kultur sel yang sesuai dengan virus uji. Titer virus stok, sampel uji, dan kontrol diperoleh kembali (*recovered*). Sitotoksitas dari sistem kultur sel inang yang disebabkan oleh zat uji atau pembawa pada konsentrasi yang diuji juga ditentukan. Campuran virus - zat uji diuji menggunakan pengulangan beberapa sumur atau labu sistem inang dengan pengenceran yang tepat di luar rentang toksisitas dari formulasi yang diuji. Sedikitnya pengulangan dilakukan tiga kali pada kontrol (tanpa perlakuan) dan sampel uji (dengan perlakuan) untuk memastikan tingkat pengurangan virus oleh jumlah lot zat uji yang dipersyaratkan oleh lembaga regulasi/pemerintah. Hasil pengujian dicatat dan log<sub>10</sub> dan/atau persen pengurangan infektivitas virus dihitung.

**4.5.1** Metode pengujian ini dirancang untuk dilakukan oleh tenaga terlatih dan berpengalaman dalam bekerja dengan virus patogen manusia dan sel inangnya. Orang tersebut juga akan bertanggung jawab untuk memilih sistem inang yang sesuai untuk virus uji, dan menerapkan teknik yang diperlukan untuk propagasi dan pemeliharaan sistem inang dan virus uji. Untuk referensi, lihat Ref (6)

## 5 Signifikansi dan penggunaan

**5.1** Metode pengujian ini dirancang untuk mengevaluasi virus menghilangkan aktivitas *handwash* dan *handrub* higienis dari tangan yang terkontaminasi secara eksperimental. Formulasi tersebut dapat dinilai lebih lanjut dalam uji klinis untuk efektivitas mereka di lapangan. Metode pengujian ini menggabungkan paparan seluruh tangan dan mencerminkan kondisi penggunaan aktual seperti gesekan selama dekontaminasi tangan, dan memungkinkan bentuk produk alternatif seperti cairan berbasis alkohol atau cairan berbasis non-alkohol, gel, dan *foams* yang akan diuji sesuai dengan petunjuk label. Hal tersebut dimaksudkan untuk memperpanjang, jika diperlukan, hasil pengujian dengan Metode Uji dalam E1838, memberikan pengurangan yang tepat dalam infektivitas virus pada area tangan terbatas. Hal ini juga berfungsi sebagai metode pengujian alternatif ketika bentuk produk tidak dapat diuji dengan Metode Uji E1838.

**5.2** Metode pengujian ini tidak dimaksudkan untuk digunakan dengan *hand scrub* bedah atau preparasi kulit pra operasi.

**CATATAN 2** Pengaplikasian virus pada seluruh permukaan kedua tangan menimbulkan risiko yang lebih besar pada subjek dibandingkan hanya menggunakan ujung jari. Oleh karena itu, diperlukan kehati-hatian yang lebih besar untuk memastikan tangan subjek bebas dari kerusakan apa pun. Selain itu, preparasi virus perlu disaring secara menyeluruh, atau didokumentasikan agar bebas dari, benda asing, atau benda tambahan patogen sebelum digunakan dalam pengujian tersebut.

**4.2** All subjects should refrain from using any antimicrobials starting at least one week prior to the experimental contamination of their hands.

**4.3** A prepared suspension of the selected test virus is grown and diluted or concentrated to produce a titer with a minimum of 10<sup>7</sup> infective units/mL. The contaminating virus is applied to the hands and the hands are treated with the test substance according to the manufacturer's directions or with a set test regimen.

**4.4** The virus titer recovered after treatment with the test substance is compared to a baseline sample.

**4.5** The virus on experimentally contaminated hands is exposed to the test substance for the length of time that is recommended by the product manufacturer and is representative of actual use conditions of the product. The virus to be recovered after exposure to the test substance is assayed in a cell culture system appropriate to the test virus. The virus titer of the stock, test samples, and controls is determined by a suitable infectivity assay. Cytotoxicity of the host cell culture system caused by the test substance or vehicle at the tested concentration is also determined. The virus-test substance mixture is assayed using multiple replicate wells or flasks of the host system at a dilution just beyond the cytotoxicity range of the formulation tested. At least three replicate determinations are performed on controls (untreated) and test samples (treated) to confirm the extent of virus elimination by the number of lots of the test substance required by the target regulatory agency. Results are recorded and log<sub>10</sub> and/or percent reduction in virus infectivity are calculated.

**4.5.1** This test method is designed to be performed by a person trained and experienced in working with human pathogenic viruses and their host cells. Such an individual will also be responsible for choosing the appropriate host system for the test virus, and applying the techniques necessary for propagation and maintenance for host system and test virus. For a reference text, see Ref (6).

## **5. Significance and Use**

**5.1** This test method is designed to evaluate the virus eliminating activity of hygienic handwash and handrub agents from experimentally-contaminated hands. Such formulations may be further assessed in a clinical trial for their effectiveness in the field. This test method incorporates whole-hand exposure and reflects actual use conditions such as friction during hand decontamination, and enables alternative product forms such as alcohol- or non-alcohol-based liquids, gels, and foamsto be tested according to label directions. It is meant to extend, if required, the results of testing with Test Method E1838, which gives precise reductions in viral infectivity on a limited area of the hands. It may also serve as an alternative test method when product form is not amenable to testing by TestMethod E1838.

**5.2** This test method is not meant for use with surgical hand scrubs or preoperative skin preparations.

**NOTE 2**—Application of viruses on the entire surface of both hands entails a greater risk to the subjects than using fingerpads only. Therefore, greater care is needed to ensure that the hands of the participants are free from any apparent damage. Also, virus preparations must be thoroughly screened for, or documented to be free from, extraneous or adventitious pathogens before use in such tests.

## 6 Peralatan dan Perlengkapan

**6.1** *Laminar Flow Cabinet* — Kelas II *biological safety cabinet*. Prosedur untuk perawatan dan penggunaan dari alat tersebut dapat dilihat pada Ref (3, 4).

**6.2** *Inkubator* — inkubator pada  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau suhu yang sesuai untuk pertumbuhan sel inang dan untuk inkubasi kultur virus penginfeksi. Jika sistem terbuka yang digunakan untuk kultur sel, inkubator  $\text{CO}_2$  disyaratkan.

**6.3** *Pipet pemindahan positif* — merupakan pipet dan pipet tips yang dapat mengukur volume 10  $\mu\text{L}$  hingga 20  $\mu\text{L}$  secara akurat.

**6.4** *Sterilizer* — setiap alat sterilisasi uap yang sesuai untuk memproses media kultur sel dan reagen dapat digunakan. Uap yang disuplai ke alat sterilisasi perlu bebas dari aditif yang beracun bagi kultur sel.

**6.5** *Sistem sterilisasi filter* — Sistem filtrasi membran atau *kartrid* (diameter pori 0,22- $\mu\text{m}$ ) dipersyaratkan untuk untuk mensterilkan media dan larutan yang sensitif terhadap panas.

**6.6** *Lemari pembeku* — lemari pembeku pada  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk penyimpanan serum dan aditif lain untuk kultur sel. Lemari pembeku kedua pada  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau lebih rendah dipersyaratkan untuk penyimpanan virus.

**6.7** *Lemari pendingin* — lemari pendingin pada  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  diperlukan untuk penyimpanan media kultur sel dan reagen.

**6.8** *Timer* — *stopwatch* terkalibrasi yang digunakan untuk membaca dalam menit dan detik.

**6.9** *Pengaduk Magnetik dan Magnet* — pengaduk magnetik dan magnet perlu cukup besar agar setiap bagian cairan dalam gelas kimia atau labu erlenmeyer 5 L dapat teraduk secara merata untuk penyajian media kultur sel atau larutan lain.

**6.10** *Wastafel*— wastafel dengan ukuran yang cukup untuk memungkinkan subjek mencuci tangan tanpa menyentuh permukaan wastafel.

**6.10.1** Keran air ditempatkan di atas wastafel pada ketinggian yang memungkinkan tangan lebih tinggi dari siku selama prosedur pencucian. Keran dengan sensor elektronik atau yang dioperasikan dengan pergelangan tangan, siku, lutut, atau kaki lebih direkomendasikan untuk menghindari kontaminasi ulang pada tangan yang dicuci.

**6.10.2** Sabun yang lembut dan terbukti non-antimikroba, sebaiknya cairan.

**6.10.3** Pengatur suhu dan pemantau suhu air keran untuk memantau dan mengatur suhu air pada  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.11** Penyimpanan nitrogen cair untuk sel — wadah untuk menyimpan nitrogen cair dan nitrogen cair yang sesuai untuk *kriopreservasi stok cell lines*.

**6.12** *Mikroskop Terbalik* — mikroskop terbalik dengan lensa mata 10 $\times$  dan objektif 5 $\times$ , 10 $\times$ , dan 40 $\times$ .

**6.13** *Pipet serologis* — pipet steril yang dapat digunakan kembali (*reusable*) atau pipet sekali pakai dengan kapasitas 10,0 ml, 5,0 ml, dan 1,0 ml atau kapasitas lain yang sesuai.



## 6. Equipment and Apparatus

**6.1** *Laminar Flow Cabinet*—a Class II biological safety cabinet. The procedures for the proper maintenance and use of such cabinets are given in Ref (3, 4).

**6.2** *Incubator*—an incubator at 35 °C  $\pm$  2 °C or other appropriate temperature for growing host cells and for incubating virus-infected cultures. If an open system is used for cell culture, a CO<sub>2</sub> incubator will be required.

**6.3** *Positive Displacement Pipette*—a pipette and pipette tips that can accurately dispense 10- $\mu$ L to 20- $\mu$ L volumes.

**6.4** *Sterilizer*—any steam sterilizer suitable for processing cell culture media and reagents. The steam supplied to the sterilizer must be free from additives toxic to cell cultures.

**6.5** *Filter Sterilization System*—a membrane or cartridge filtration system (0.22- $\mu$ m pore diameter) is required for sterilization of heat-sensitive media and solutions.

**6.6** *Freezers*—a freezer at -20 °C  $\pm$  2 °C for the storage of serum and other additives for cell culture media. A second freezer at -70 °C or lower is required to store viruses.

**6.7** *Refrigerator*—a refrigerator at 4 °C  $\pm$  2 °C is necessary for storage of prepared cell culture media and reagents.

**6.8** *Timer*—any calibrated stopwatch that can be read in minutes and seconds.

**6.9** *Magnetic Stirrer and Magnets*—magnetic stirrer and magnets must be large enough to hold a 5-L beaker or Erlenmeyer flask for preparing cell culture media or other solutions.

**6.10** *Handwashing Sink*—a sink of sufficient size to permit subjects to wash hands without touching hands to sink surface.

**6.10.1** Water faucet(s) are to be located above the sink at a height that permits the hands to be held higher than the elbow during the washing procedures. Faucets with electronic sensors or those that are wrist-, elbow-, knee-, or foot-operated are preferred to avoid recontamination of the washed hands.

**6.10.2** Mild, proven non-antimicrobial soap, preferably liquid.

**6.10.3** Tap water temperature regulator and temperature monitor to monitor and regulate water temperature at 40 °C  $\pm$  2 °C.

**6.11** *Liquid Nitrogen Storage for Cells*—an appropriate liquid nitrogen container and liquid nitrogen for cryopreservation of cell line stocks.

**6.12** *Inverted Microscope*—an inverted microscope with 10 $\times$  eye pieces and 5 $\times$ , 10 $\times$ , and 40 $\times$  objectives.

**6.13** *Serological Pipettes*—sterile reusable or single-use pipettes of 10.0-, 5.0-, and 1.0-mL capacity or other suitable capacity

**6.14** *Labu kultur sel* — labu plastik kultur sel kapasitas 25 cm<sup>2</sup> atau 75 cm<sup>2</sup> atau labu yang sesuai dengan kapasitas untuk pengkultur sel dan untuk penyiapan kumpulan virus.

**CATATAN 3** Setiap labu plastik untuk pertumbuhan sel *monolayers* dapat digunakan ulang dengan penyemaian dengan kultur sel baru hingga 10 kali sebelum dibuang.

**6.15** *Plastik dan Vial kaca, Obat (Medicant)* — vial steril bertutup (*screw-capped vials*) dipersyaratkan untuk penyimpanan sampel.

**6.16** *Peralatan Laboratorium lainnya* — pipet otomatis, pipet tip, vial plastik untuk penyimpanan sel dan stok virus, tabung pengencer, klaster tisu (*cluster plates*) atau labu untuk titrasi virus.

**6.17** *Glass Beads* steril — diameter 3,5 mm.

**6.18** *Corong gelas atau plastik*— diameter 27 cm.

**6.19** *Gelas beaker* atau plastik— kapasitas 200 mL.

## 7 Bahan dan Reagen

**7.1** *Media kultur sel dan Suplemen* — Media kultur, jenis, dan rasio suplemen bervariasi tergantung *cell line*. Sebagai contoh, "Eagle's" *minimal essential medium* (EMEM) dengan 5 % sampai 10 % serum janin sapi (penguji virus- dan *mycoplasma*) digunakan untuk pertumbuhan berbagai macam sel (lihat Catatan 4). Antibiotik boleh dipersyaratkan dalam media untuk menekan kontaminasi bakteri.

### 7.2 *Beban tanah (Soil load)*:

**7.2.1** Serum sapi pada konsentrasi akhir dari 5 % pada inokulum virus (lihat Catatan 4), jika dipersyaratkan untuk pengujian

**CATATAN 4** Serum tidak cocok digunakan sebagai beban tanah dengan rotavirus disebabkan aktivitas inhibitor rotavirus dan netralisasi trypsin.

**7.2.2** *Beban tanah tripartite*, sebagai alternatif pada serum disiapkan dari larutan stok dalam *dapar* fosfat (pH 7.2 sampai 7.4).

**7.2.2.1** Tambahkan 0,5 g *trypton* atau ekstrak *yeast* pada 10 ml larutan *dapar*

**7.2.2.2** Tambahkan 0,5 g *bovine serum albumin* (BSA) pada 10 ml larutan *dapar*.

**7.2.2.3** Tambahkan 0,04 g *bovine mucin* pada 10 mL larutan *dapar*.

**7.2.2.4** Buat larutan stok terpisah dan sterilkan melalui penyaring membran yang mempunyai diameter pori 0,22- $\mu$ m, aliquot dan disimpan pada suhu 4°C  $\pm$  2°C atau -20°C  $\pm$  2°C. Gunakan selama umur simpan yang tervalidasi.

**7.2.2.5** Untuk memperoleh 500- $\mu$ L inokulum dari inokulum uji, tambahkan pada 340  $\mu$ L suspensi mikroba 25  $\mu$ L BSA, 100  $\mu$ L mucin, dan 35  $\mu$ L *tryptone*/ekstrak *yeast* larutan stok. Campuran ini mengandung lebih kurang 2 g protein total/L, yang lebih kurang sama dengan kandungan protein pada 5% larutan serum janin sapi.

**6.14** *Cell Culture Flasks*—plastic cell culture flasks of 25 cm<sup>2</sup> or 75 cm<sup>2</sup> or other suitable capacity for culturing cells and for preparing virus pools.

**NOTE 3**—Each plastic flask for growing cell monolayers can be reused by reseeding with new cell cultures up to 10 times before being discarded.

**6.15** *Plastic and Glass Vials, Medication (Medicant)*—sterile screw-capped vials will be required for storage of samples.

**6.16** *Miscellaneous Labware*—automatic pipettes, pipette tips, plastic vials for storing cell and virus stocks, dilution tubes, cluster plates or flasks for virus titration.

**6.17** *Sterile Glass Beads*—3.5 mm in diameter.

**6.18** *Glass or Plastic Funnel*—27 cm in diameter.

**6.19** *Glass or Plastic Beaker*—200 mL in capacity.

## 7. Materials and Reagents

**7.1** *Cell Culture Media and Supplements*—Culture media and the types and ratios of supplements will vary depending on the cell line. For example, Eagle's minimal essential medium (EMEM) with 5 % to 10 % fetal bovine serum (virus- and mycoplasma-tested) is used for growing a wide variety of cells (see Note 4). Antibiotics may be required in the medium to suppress bacterial contamination.

**7.2** *Soil Load:*

**7.2.1** Bovine serum, at a final concentration of 5 % in the virus inoculum (see Note 4), if required for the test.

**NOTE 4**—Serum is considered unsuitable for use as a soil load with rotaviruses because of its rotavirus-inhibitory and trypsin-neutralizing activity.

**7.2.2** A tripartite soil load, as an alternative to serum, is prepared from the following stock solutions in phosphate buffer (pH 7.2 to 7.4).

**7.2.2.1** Add 0.5 g of tryptone or yeast extract to 10 mL of the buffer.

**7.2.2.2** Add 0.5 g of bovine serum albumin (BSA) to 10 mL of the buffer.

**7.2.2.3** Add 0.04 g of bovine mucin to 10 mL of the buffer.

**7.2.2.4** Prepare the stock solutions separately and sterilize by passage through a 0.22- $\mu$ m pore diameter membrane filter, aliquot and store at either 4 °C 6 2 °C or -20 °C 6 2 °C. Use within a validated shelf-life.

**7.2.2.5** To obtain a 500- $\mu$ L inoculum of the test inoculum, add to 340  $\mu$ L of the microbial suspension 25  $\mu$ L BSA, 100  $\mu$ L mucin, and 35  $\mu$ L of tryptone/yeast extract stock solutions. This mixture contains approximately 2 g of total protein/L, which is approximately equivalent to the protein content of a 5 % solution of fetal bovine serum.

**7.3 Air sadah standar**— Air disiapkan sesuai dengan AOAC 960.9 dengan standar kesadahan 200 ppm sebagai kalsium karbonat yang digunakan untuk melarutkan zat uji. Hal ini merupakan larutan kontrol untuk menetapkan tingkat dasar (*baseline level*) dari eliminasi virus dan untuk membilas tangan setelah terpapar zat uji.

**7.4 Jumlah dari lot zat uji yang digunakan**— jumlah lot yang diproduksi terpisah (*batches*) dari setiap formulasi uji akan diuji tergantung pada persyaratan dari target badan regulator.

**7.5 Pengencer untuk titrasi virus** — *Earle's balanced salt solution* (EBSS) atau pelarut medium lain yang sesuai dengan pH 7,2 sampai 7,4.

**7.6 Eluen untuk perolehan kembali virus dari tangan** — EBSS atau media pengencer lain yang sesuai yang mengandung 1 % pepton dan 0,1 % Polisorbit 80 pada konsentrasi akhir.

**7.7 Sarung tangan steril sekali pakai** — Longgar, tidak bergaris, bebas bubuk, yang mana tidak memiliki antiviral atau sarana sitotoksik atau setara. (Kantong plastik dengan jumlah *bioburden* yang rendah mungkin digunakan sebagai pengganti sarung tangan.)

## 8 Uji Virus dan kultur sel

**8.1** Lihat Lampiran X1 untuk virus dan sel inang yang direkomendasikan.

**8.2** Stok virus serta sel inang yang digunakan untuk virus propagasi mungkin mengandung virus tambahan atau patogen lainnya yang berpotensi membahayakan subjek manusia. Oleh karena itu, sebaiknya sangat berhati-hati dalam pemilihan dan penggunaan bahan-bahan tersebut untuk diterapkan pada tangan manusia.

## 9 Penyiapan stok virus dan determinasi titer infeksi

**9.1** Gunakan sel inang yang sesuai untuk membuat kumpulan virus. Kumpulan virus sebaiknya mengandung  $\geq 10^7$  unit infeksiif/mL.

**9.2** Menghilangkan pertumbuhan atau pemeliharaan media dan inokulasi 0,1 ml virus (labu kontrol berisi 0,1 mL EBSS ) pada setiap labu (sebagai contoh, 75 cm<sup>2</sup>) dengan aliran sel *monolayer* dan diamkan 60 menit sampai 120 menit untuk adsorpsi virus. Masukkan 15 mL media pemeliharaan ke dalam setiap labu inokulat dan inkubasi kembali kira kira 75% sampai 95 % dari setiap sel *monolayer* yang diinfeksi menunjukkan induksi virus *cytopathology*. Kontrol *monolayer* perlu bebas dari degenerasi atau kontaminasi. Bekukan (–20 °C sampai –90 °C) dan cairkan (suhu ruang) labu yang terinfeksi tiga kali untuk mengganggu sel inang dalam pelepasan virus. *Sentrifus* suspensi sel pada 4 °C selama 10 menit sampai 20 menit pada lebih kurang 1.000 × *g* sampai terbentuk endapan *cell debris*, kumpulkan supernatan. Jika perlu alikuot dan disimpan pada –6 °C sampai –90 °C dalam alikuot yang sesuai.

**CATATAN 5** Ukuran labu alternatif, volume inokulum, dan/atau volume medium yang sesuai mungkin digunakan.

**9.3** Titer  $\geq 10^7$  unit infeksiif/mL yang dipersyaratkan untuk pengujian dan ultra-sentrifugasi dari kumpulan virus mungkin diperlukan untuk mencapai tingkat infeksiivitas untuk kontaminasi pada tangan.

**7.3 Standard Hard Water**—Water prepared according to AOAC 960.9 to a standard hardness of 200 ppm as calcium carbonate is used for dilution of test substance. This is the control solution to determine the baseline level of virus elimination, and to rinse the hands after exposure to the test substance.

**7.4 Number of Test Substance Lots to be Used** — The number of separate manufactured lots (batches) of each test formulation to be tested will depend on the specific requirements of the target regulatory agency.

**7.5 Diluent for Virus Titration** — Earle's balanced salt solution (EBSS) or other appropriate dilution medium with a pH of 7.2 to 7.4.

**7.6 Eluent for Virus Recovery from Hands** — EBSS or other appropriate dilution medium containing 1 % peptone and 0.1 % Polysorbate 80 at final concentrations.

**7.7 Sterile Disposable Gloves** — Loose-fitting, unlined, powder-free gloves which possess no antiviral or cytotoxic properties, or equivalent. (Plastic bags with low bioburden may be used in place of gloves.)

## 8. Test Viruses and Cell Cultures

**8.1** See Appendix X1 for suggested viruses and host cells.

**8.2** Virus stocks as well as host cells used for virus propagation may contain adventitious viruses or other pathogens potentially harmful to human subjects. Therefore, great care should be used in the selection and use of such materials to be applied on human hands.

## 9. Preparation of Virus Stocks and Determination of Infectivity Titer

**9.1** Use appropriate host cells to prepare the virus pool. The virus pool should contain  $\geq 10^7$  infective unit/mL.

**9.2** Remove growth or maintenance medium and inoculate 0.1 mL of virus (control flasks receive 0.1 mL of EBSS instead) into each flask (for example, 75 cm<sup>2</sup>) with a confluent cell monolayer and allow 60 to 120 min for virus adsorption. Place 15 mL of maintenance medium into each inoculated flask and reincubate until about 75 % to 95 % of each infected cell monolayer shows virus-induced cytopathology. Control monolayers must remain free from any apparent degeneration or contamination. Freeze (–20 to –90 °C) and thaw (room temperature) the infected flasks three times to disrupt host cells for virus release. Centrifuge the cell suspension at 4 °C for 10 min to 20 min at approximately 1000 ×g to sediment the cell debris, collect supernatant, aliquot if necessary, and store it at –6 °C to –90 °C in suitable aliquots.

**NOTE 5**—Alternative flask size, inoculum volume, and/or medium volume may be used as appropriate.

**9.3** A titer of  $\geq 10^7$  infective units/mL is required for the testing and ultra-centrifugation of virus pools may be needed to achieve such levels of infectivity for the contamination of hands

## 10 Kontrol

**10.1** *Sel kontrol* — Untuk memastikan sel inang tidak terkontaminasi bakteri, jamur atau *sitopatogenis* virus selain yang digunakan dalam pengujian, setidaknya dua sel inang lapisan *monolayer* tidak diberi perlakuan pada setiap pengujian dan pengujian pertama pada akhir periode inkubasi. Kontaminasi atau degenerasi pada *monolayer* tersebut akan membuat pengujian menjadi tidak valid.

**10.2** *Kontrol kerentanan virus* — Untuk memastikan bahwa sel inang tetap peka terhadap virus uji, setidaknya tiga sel inang *monolayer* menerima tingkat pengujian kerentanan virus yang cukup untuk menghasilkan *cytopathology*. Kurangnya efek *cytopathic* yang disebabkan oleh virus yang jelas dan khas pada *monolayer* juga akan membuat pengujian menjadi tidak valid.

**10.3** *Kontrol sitotoksitas* — Kontrol ini digunakan pada penetral yang digunakan dalam pengujian dan untuk pengujian bahan agen *handrub*. Tujuannya adalah untuk menentukan apakah residu zat uji dalam eluat yang dinetralkan dapat menghasilkan degenerasi yang nyata (sitotoksitas) dari garis sel untuk mengukur infektivitas viral.

**10.3.1** Tempatkan 0.5 mL EBSS atau media lain yang sesuai sebagai inokulum tiruan di tangan subjek yang ditangkupkan dan instruksikan subjek untuk menggosok tangan dengan gerakan menyabuni tidak sampai keatas pergelangan tangan selama 90 detik. Kemudian letakkan tangkupan tangan pada *handrub* dengan volume sama seperti persyaratan uji. Bilas tiap tangan dengan 40 ml eluen yang mengandung penetral (lihat 10.5). Inokulasi sel inang *monolayer* dengan eluat, dan inkubasi pada  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau suhu yang sesuai pada jumlah hari untuk uji virus. Pada akhir dari periode inkubasi, amati sel *monolayer* menggunakan mikroskop untuk tanda toksisitas. Tidak ada adanya degenerasi menandakan sel bebas dari sitotoksitas yang dapat mengganggu penilaian untuk infektivitas viral. Jika terdeteksi sitotoksitas, dibutuhkan penetral yang berbeda atau menggunakan alternatif lainnya (7) untuk penghilangan/pengurangan sitotoksitas.

**10.3.2** Inokulasi *monolayer* sel inang dengan eluat yang digunakan sebagai penetral dan inkubasi pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau suhu lainnya yang sesuai dan penentuan jumlah hari yang sesuai dengan pengujian virus. Di akhir masa inkubasi, amati sel *monolayer* dalam mikroskop terbalik untuk tanda-tanda sitotoksitas. Tidak adanya degradasi sel menandakan bebas dari sitotoksitas yang dapat mengganggu penilaian untuk infektivitas virus. Jika terdeteksi sitotoksitas, dibutuhkan penetral yang berbeda atau menggunakan alternatif lainnya (7) untuk penghilangan/pengurangan sitotoksitas.

**10.4** Kontrol untuk pengganggu infektivitas viral — Kontrol ini hanya untuk *handrub*. Level uji zat yang tidak menunjukkan sitotoksitas yang jelas masih bisa mengurangi atau meningkatkan kemampuan virus untuk menularkan atau mereplikasi pada sel inang, dapat mengganggu penetapan aktivitas virucidal. Kontrol penghambat perlu dimasukkan kedalam aturan diluar kemungkinan seperti itu.

**10.4.1** kontrol ini dapat dilakukan menggunakan eluat yang sama seperti tertera dalam 10.3. Pertama, paparkan sel *monolayer* pada eluat atau media kultur sel dengan atau tanpa penetral (kontrol) selama 60 menit dan kemudian kemampuan ditentukan dengan jumlah dari unit infektivitas dari virus uji. Selesaikan sisanya dari prosedur untuk penetapan infektivitas dari inkubasi kultur seperti yang dibutuhkan untuk kemampuan virus. Perbedaan signifikan apapun (lebih besar dari  $\pm 1.0 \log_{10}$ ) dalam titer infektivitas viral terindikasi dari zat uji dan/atau kemampuan penetral untuk mempengaruhi kerentanan viral dari sel inang. Dalam kasus seperti itu, penggunaan penetral yang berbeda atau pendekatan alternatif untuk menghilangkan residu zat uji dalam sampel yang dititrasasi infektivitas viral mungkin diperlukan.

## 10. Controls

**10.1 Cell Control**—To ensure that the host cells are not contaminated with bacteria, fungi, or any cytopathogenic viruses other than those used in the test, at least two host cell monolayers are left untreated in each test and examined first at the end of the incubation period. Any obvious contamination or degeneration in such monolayers would invalidate the assay.

**10.2 Virus Susceptibility Control**—To ensure that the host cells remain susceptible to the test virus, at least three host cell monolayers will receive a level of the test virus sufficient to produce cytopathology. A lack of obvious and typical virus-induced cytopathic effects in such a monolayer would also invalidate the test.

**10.3 Cytotoxicity Control**—This control applies to neutralizers used in the test and for tests which utilize handrub agents. Its objective is to determine if residues of the test substance in the neutralized eluates can produce any apparent degeneration (cytotoxicity) of the cell line for measuring viral infectivity.

**10.3.1** Place 0.5 mL of EBSS or other appropriate medium as a mock inoculum in the cupped hands of the subject and ask him/her to rub them together in a lathering motion not reaching above the wrists for 90 s. Then place in the cupped hands the same volume of the handrub as required for the test. Elute each hand with 40 mL of an eluent containing an appropriate neutralizer (see 10.5). Inoculate host cell monolayers with the eluate, and incubate at 35 °C ± 2 °C or another appropriate temperature for the number of days suitable for the test virus. At the end of the incubation period, observe the cell monolayer in an inverted microscope for any signs of cytotoxicity. Absence of any apparent degeneration of the cells indicates freedom from cytotoxicity that could interfere with the scoring for viral infectivity. If cytotoxicity is detected, a different neutralizer or alternative approaches (7) to the removal/reduction of cytotoxicity may be needed.

**10.3.2** Inoculate host cell monolayers with the eluate used as the neutralizer and incubate at 35 °C ± 2 °C or another appropriate temperature for the number of days suitable for the test virus. At the end of the incubation period, observe the cell monolayer in an inverted microscope for any signs of cytotoxicity. Absence of any apparent degradation of the cells indicates freedom from cytotoxicity that could interfere with the scoring for viral infectivity. If cytotoxicity is detected, a different neutralizer or alternative approaches (7) to removal/reduction of cytotoxicity may be needed.

**10.4 Control for Interference with Viral Infectivity**—This control also applies to handrub agents only. Levels of the test substance which show no obvious cytotoxicity could still reduce or enhance the ability of the challenge virus to infect or replicate in host cells, thus interfering with the determination of its virucidal activity. An interference control must, therefore, be included to rule out such a possibility.

**10.4.1** This control can be run using the same eluate as described in 10.3. First, expose the cell monolayers to the eluate or cell culture medium with or without neutralizer (controls) for 60 min and then challenge them with a defined number of infective units of the test virus. Complete the rest of the procedure for an infectivity assay and incubate the cultures as needed for the challenge virus. Any significant difference (greater than 61.0 log<sub>10</sub>) in the viral infectivity titer is indicative of the test substance's and/or the neutralizer's ability to affect the viral susceptibility of the host cells. In such a case, a different neutralizer or alternative approaches to the removal of the test substance residues in the samples to be titrated for viral infectivity may be needed.

## 10.5 Validasi Netralisasi:

**10.5.1** Agen *Handwash* — aktivitas *virucidal* dari zat uji perlu dinetralisasi secepatnya pada akhir dari waktu paparan untuk keakuratan pengukuran pada waktu kontak (Metode uji E1482), hal ini tidak mudah dicapai pada uji agen *handwash* seperti yang digambarkan disini. Perlakuan pada tangan yang terkontaminasi dengan zat uji segera diikuti pencucian tangan dengan 500 mL air sadah dan keringkan dengan tisu. Langkah-langkah tambahan ini, yang merupakan bagian integral dari prosedur normal *handwash*, secara bertahap dapat mengurangi kadar zat uji yang tersisa ditangan dengan pencatatan pengurangan aktivitas *virucidal*. Oleh karena itu eluat tidak dipersyaratkan netralisasi aktif sebelum penetapan infektivitas.

**10.5.2** Agen *Handrub* — Tambahkan penetral pada eluen (*EBSS-peptone* atau yang ekuivalen) saat bekerja dengan *handrub* dan validasi bahwa penetral akan berhasil menginaktivasi bahan aktif terhadap uji virus.

**10.5.2.1** Tambahkan sejumlah unit infeksi yang dapat dihitung dari uji virus pada 10 ml eluen dengan penetral dan diamkan suspensi selama 10 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol, gunakan eluen tanpa penetral.

**10.5.2.2** Penetapan kadar suspensi untuk virus menular (*infectious*). Netralisasi dipertimbangkan untuk divalidasi jika tingkat virus menular diperoleh kembali dari eluen dengan netralisasi dan media kultur sel sama ( $\pm 1,0 \lg_{10}$ ).

## 11 Pembersihan dan dekontaminasi tangan sebelum percobaan kontaminasi

**11.1** Segera dalam percobaan kontaminasi memprioritaskan untuk menginstruksikan setiap subjek mencuci tangan dengan sabun lembut yang terbukti non antimikroba selama 1 menit dibawah alir mengalir kemudian keringkan dengan tisu.

**11.2** Basahi tangkupan tangan dengan lebih kurang 5 mL etanol 80 % (v/v) dan instuksikan subjek menggosok seluruh permukaan kedua tangan hingga kedua tangan sepenuhnya kering. Untuk memastikan tangan bersih dari residu, subjek dibilas dengan lebih kurang 200ml air steril deionisasi dan keringkan dengan udara kering. Pembilasan air ini opsional.

## 12 Prosedur untuk kontaminasi Viral pada tangan dan aplikasi dari uji zat/ cairan kontrol

### 12.1 Metode untuk agen *Handwash*

**12.1.1** Kontaminasi Viral pada tangan — Segera setelah mencuci tangan seperti pada pasal 11, tuangkan 1.5 mL suspensi virus uji pada telapak tangan tangkupan tangan kiri dari subjek dan distribusikan inokulum dengan mencuci pada seluruh permukaan kedua tangan ( tidak pada pergelangan tangan). Sebarkan suspensi selama 90 detik dan biarkan kering 90 detik. Untuk pada *baseline* virus yang bertahan di tangan dapat dipulihkan dengan Metode Menggosok dan Membilas (12.1.4).

**12.1.2** Untuk subjek yang menggunakan bahan uji, perlakukan tangan dengan bahan uji sebagai berikut: Basahkan kedua tangan dengan 10 ml air sadah steril dan tambahkan sejumlah volume zat uji, seperti yang ditentukan oleh produsen atau dalam serangkaian uji regimen kepada subjek tangkupan tangan dan sebarkan gerakan tangan menyabuni selama 20 detik dengan cara yang sama seperti pada T Ref (8, 9). Untuk kontrol gunakan EBSS dengan volume sama atau media lain yang sesuai sebagai pengganti untuk zat uji.



## 10.5 Validation of Neutralization:

**10.5.1 Handwash Agents**—While the virucidal activity of the test substance must be neutralized as soon as possible at the end of the exposure period for an accurate measure of the contact time (Test Method E1482), this is not readily attainable in testing handwash agents as described here. The treatment of the contaminated hands with such test substances is immediately followed by rinsing of the hands with 500 mL of hard water and then drying with paper towels. These additional steps, which are an integral part of a normal handwash procedure, may incrementally reduce the levels of any test substance remaining on the hands with a corresponding reduction in virucidal activity. Therefore, the eluates may not require any active neutralization before infectivity assays.

**10.5.2 Handrub Agents**—Add a suitable neutralizer to the eluent (EBSS-peptone or equivalent) when working with handrubs and validate that it can successfully quench the activity of the active ingredient(s) against the test virus(es).

**10.5.2.1** Add a countable number of infective units of the test virus to 10 mL of the eluent with the neutralizer and hold the suspension for 10 min at room temp. For control, use the eluent without the neutralizer.

**10.5.2.2** Assay the suspensions for infectious virus. The neutralization is considered to be validated if the level of infectious virus recovered from the eluents with neutralizer and the cell culture medium are similar ( $61.0 \log_{10}$ ).

## 11. Cleaning and Decontamination of Hands Before Experimental Contamination

**11.1** Immediately prior to the experimental contamination, instruct each subject to wash his/her hands with a mild, proven non-antimicrobial soap for 1 min under running tap water and then dry them thoroughly with paper towels.

**11.2** Place approximately 5 mL of 80 % (v/v) ethanol in the cupped hands and instruct subject to rub it over the entire surface of both hands till the hands are thoroughly dry. To ensure a complete removal of any remaining residue, subjects' hands may further be rinsed with approximately 200 mL of sterile deionized water and dried by an air blower. This water-rinse step is optional.

## 12. Procedures for Viral Contamination of Hands and Application of Test Substance/Control Fluids

### 12.1 Method 1 for Handwash Agents:

**12.1.1 Viral Contamination of the Hands**—Immediately after washing hands as directed in Section 11, place 1.5 mL of the test virus suspension onto the palm of the cupped left hand of the subject and distribute the inoculum with washing movements over the entire surface of both hands (not on wrists). Spread suspension for 90 s and allow to dry another 90 s. For baseline the surviving virus on the hands is recovered by Rubbing and Rinsing Method (12.1.4).

**12.1.2** For subjects using test substance, treat hands with the test substance as follows: Moisten the hands with 10 mL of sterile hard water and then place the amount/volume of the test substance, as specified by the manufacturer or in the set test regimen, into the subject's cupped hands and spread with lathering movements for manufacturer recommended time (for example, 20 s) in a fashion similar to that described in Ref (8,9).

**12.1.3** Secara bertahap tuangkan 500 mL air sadah steril ke kedua tangan subjek selama kurang lebih 15 detik gosok kedua tangan sambil dibilas dengan pergerakan. Seperti pembilasan sebaiknya kedua tangan ditahan pada wadah yang berisi lebih kurang 500 ml dari 1: 10 larutan pemutih (5% Natrium hipoklorit) untuk menangkap dan menginaktifkan virus. Keringkan tangan subjek seluruhnya dengan udara atau tisu steril (metode pengeringan perlu sama dengan yang digunakan pada seluruh pengujian) selama 15 detik. Kemudian, virus yang bertahan hidup pada tangan dapat dipulihkan dengan Metode Menggosok dan Membilas (12.1.4).

**12.1.4** Perolehan kembali dari Virus sebelum perlakuan agen uji — Tempatkan corong steril (diameter 27 cm) ke dalam gelas kimia steril berukuran 200 mL. Perintahkan subjek untuk meletakkan tangannya di atas corong dan tuangkan secara bertahap 20 mL EBSS-*pepton* atau media elusi lainnya (dengan penetralisir, jika perlu) ke atasnya sambil menggosok kedua tangan untuk mengelusi virus yang tersisa. Tidak kurang dari 2 mL (~10 %) eluat harus diuji infektivitas virusnya.

**12.1.5** Pada akhir proses elusi, setiap subjek harus dekontaminasi tangan dengan memasukkan 5 mL dengan perbandingan 1:10 pengenceran dari *domestic bleach* (sekitar 5 % natrium hipoklorit) atau 80 % (v/v) etanol ke dalam tangkupan tangan subjek dan subjek perlu untuk menggosok pemutih atau etanol secara menyeluruh permukaan kedua tangan selama minimal 2 menit. Kemudian dilanjutkan mencuci tangan secara menyeluruh dengan sabun biasa dan keringkan dengan tisu.

**12.2** Metode untuk agen *handrub*:

**12.2.1** Kontaminasi tangan subjek menggunakan metode tersebut dijelaskan dalam 12.1.1.

**12.2.2** Jangan membasahi tangan terlebih dahulu.

**12.2.3** Tempatkan volume zat uji sesuai yang ditentukan oleh produsen atau dalam regimen pengujian yang ditetapkan, ke dalam subjek menangkupkan tangan dan instruksikan subjek untuk menggosok zat uji ke seluruh permukaan kedua tangan sampai kering.

**12.2.4** Jangan mencuci tangan dengan air atau mengeringkannya dengan tisu.

**12.2.5** Virus yang bertahan di tangan dapat dipulihkan oleh Metode Menggosok dan Membilas 12.1.4.

**12.2.6** Dekontaminasi tangan subjek seperti yang dijelaskan dalam 12.1.5.

**12.3** Pengujian Virus Menular— Uji eluasi dan pengendalian virus menular pada lapisan tunggal inang yang rentan sel menggunakan uji plak atau metode berdasarkan sel 50%. Dosis infeksi kultur (TCID<sub>50</sub>).

## 13 Kalkulasi dari reduksi dalam infektivitas virus

**13.1** Reduksi log<sub>10</sub> dalam infektivitas virus dihitung dengan mengurangi infektivitas I<sub>g</sub> yang pulih dari tangan setelah penerapan zat uji dari yang diperoleh setelah pengaplikasian dasar.

**12.1.3** Gradually pour 500 mL of sterile hard water over both hands of the subject for at least 15 s while the subject rubs hands together to simulate rinsing movements. Such rinsing should be with the hands held over a bowl containing at least 500 mL of a 1:10 dilution of domestic bleach (~5 % sodium hypochlorite) to capture and inactivate the virus. Dry subjects' hands thoroughly with either an air blower or sterile paper towel (the same drying method must be used for the entire test) for 15 s. Then, surviving virus on the hands is recovered by the Rubbing and Rinsing Method (12.1.4).

**12.1.4** Recovery of Virus —Rubbing and Rinsing Method— Place a sterile funnel (27-cm diameter) in a 200-mL sterile beaker. Instruct the subject to place hands over the funnel and gradually pour 20 mL of EBSS-peptone or other elution medium (with neutralizer, if necessary) over them while he/shen rubs hands together to elute any remaining virus. No less than 2 mL (~10 %) of the eluate shall be assayed for viral infectivity.

**12.1.5** At the end of the elution process, each subject shall decontaminate the hands by placing 5 mL of a 1:10 water dilution of domestic bleach (~5 % sodium hypochlorite) or 80 % (v/v) ethanol into the cupped hands of the subject and requiring him/her to rub the bleach or ethanol thoroughly over the surface of both hands for at least 2 min. This is to be followed by a thorough washing of hands with plain soap and drying with paper towel.

## **12.2** Method for Handrubs:

**12.2.1** Contaminate the subject's hands using the method described in 12.1.1.

**12.2.2** Do not pre-moisten the hands.

**12.2.3** Place the volume of the test substance, as specified by the manufacturer or in the set test regimen, into the subject's cupped hands and instruct the subject to rub the test substance over the entire surface of both hands until dry. **12.2.4** Do not wash hands in water or dry them with paper towel.

**12.2.5** Surviving virus on the hands is recovered by the Rubbing and Rinsing Method 12.1.4.

**12.2.6** Decontaminate the subject's hands as described in 12.1.5.

**12.3** Assaying for Infectious Virus— Assay the eluates and controls for infectious virus in monolayers of susceptible host cells using a plaque assay or a method based on 50 % cell culture infective dose (TCID<sub>50</sub>).

## **13. Calculation of Reduction in Virus Infectivity**

**13.1** The log<sub>10</sub> reduction in virus infectivity is calculated by subtracting log infectivity recovered from the hands after the application of the test substance from that recovered after the baseline application.

## 14 Presisi dan bias

### 14.1 Presisi:

**14.1.1** Studi keterulangan retrospektif dari metode uji ini dilakukan untuk tiga kali penentuan replikasi dilakukan di satu laboratorium (Laboratorium *Bioscience*) pada pengujian tiga hari yang terpisah. Larutan uji tunggal, berbahan dasar alkohol *handrub* (*alcohol-based hand rub*/ABHR), control larutan tunggal, EBSS dan virus tunggal (Murine Norovirus Tipe 1) dievaluasi. Standar deviasi (SD) keterulangan digunakan untuk menentukan keterulangan zat uji. Operator dilatih tentang metode pengujian ini.<sup>5</sup>

**14.1.2** Reduksi log<sub>10</sub> rata-rata keseluruhan untuk pengujian tersebut larutan dari larutan kontrol adalah 2,383 dengan SD sebesar 0,731.

### 14.2 Bias:

**14.2.1** Karena tidak ada bahan referensi yang diterima dan cocok untuk bias dalam praktik ini, maka tidak ada pernyataan tentang bias yang dibuat.

## 15 Kata kunci

**15.1** adenovirus; antiseptis; antiseptik; calicivirus; *Handrubbing*; *Handwashing*; *in vivo*; norovirus; rhinovirus; rotavirus; pengambilan sampel kulit; infeksi virus; aktivitas virus; aktivitas eliminasi virus.

---

<sup>5</sup> Data pendukung telah diajukan di Kantor Pusat Internasional ASTM dan mungkin diperoleh dengan meminta Laporan Penelitian RR:E35-2000. Hubungi Pelanggan ASTM Layanan di [service@astm.org](mailto:service@astm.org).

## 14. Precision and Bias

### 14.1 Precision:

**14.1.1** A Retrospective repeatability study of this test method was conducted for three replicate determinations performed at a single laboratory (Bioscience Laboratories) on three separate test days. A single test solution, alcohol-based hand rub (ABHR), a single control solution, Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) and a single virus (Murine Norovirus Type 1) were evaluated. Repeatability standard deviation was used to determine the repeatability of the test substance. Operators were trained on this test method.<sup>5)</sup>

**14.1.2** The overall mean log<sub>10</sub> reduction for the test solution from the control solution was 2.383 with a repeatability SD of 0.731.

### 14.2 Bias:

**14.2.1** Because there are no accepted reference materials suitable for the bias in this practice, no statement on bias is made.

## 15. Keywords

**15.1** adenovirus; antiseptics; antiseptics; calicivirus; handrubbing; handwashing; in vivo; norovirus; rhinovirus; rotavirus; skin sampling; viral infection; virucidal activity; virus eliminating activity

---

<sup>5)</sup> Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR:E35-2000. Contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org)

## Lampiran (Informasi tidak wajib)

### X1 Virus dan sel inang direkomendasikan untuk digunakan pada protokol uji

**X1.1** Pilihan virus uji berikut berdasarkan pada (a) keamanan relatif mereka sebagai subjek penelitian, (b) kemampuan tumbuh menjadi titer cukup tinggi untuk pengujian, (c) kemampuan menghasilkan efek "cytopathic" atau "plaques", atau keduanya dalam kultur sel (d) berpotensi untuk penyebaran melalui kontaminasi tangan dan (e) relatif resisten pada penggunaan sediaan *handwash* higienis dan agen *handrub*. *Strain* atau jenis virus lain boleh diganti sesuai dengan kriteria diatas

**CATATAN X1.1** Belum ada informasi yang cukup atau apakah sebuah bagian sejarah, kondisi kultur, dan perbedaan "*strain*" dari virus dapat mempengaruhi efisiensi eliminasi dari agen *handwash* higienis. Oleh karena itu peringatan dapat dilakukan bila pengganti virus seperti ini mungkin merupakan hasil variasi dari satu laboratorium untuk yang lain.

**X1.2** *Human Rotavirus Wa* (ATCC VR-201 8) dengan CV-1 (ATCC CCL-70) atau MA-104 (ATCC CRL-2378.1) sel sebagai inang. Sebelum inokulasi rotavirus, monolayer sel perlu dicuci paling sedikit tiga kali dengan EBSS atau "*Phosphate Buffered Saline* (PBS)" untuk menghilangkan serum dari pertumbuhan atau penyemaian media. Semua diluen pemeliharaan media dan lapisan agar (jika dapat dipakai) perlu bebas dari serum. Rotavirus sangat memerlukan adanya trypsin dalam medium untuk infeksi.

**X1.3** *Human Rhinovirus* Tipe 37 (ATCC VR-1147) atau 14 (ATCC VR-284) dan MRC-5 (ATCC CCL-171), H1-HeLa (ATCC CRL-1958), atau WI-38 (ATCC CCL-75) sel untuk kultur dan penetapan infektivitas.

**X1.4** *Feline calicivirus* (ATCC VR-782); garis sel yang direkomendasikan adalah CrFK (ATCC CCL-94). Virus ini digunakan sebagai pengganti untuk *human norovirus*.

**X1.5** Murine Norovirus (*Washington University* atau sumber lain yang sesuai); garis sel yang direkomendasikan adalah RAW 264.7 (ATCC TIB-71). Virus ini digunakan sebagai pengganti lain untuk *human norovirus*.

**X1.6** *Human Adenovirus* Tipe 5 (ATCC VR-1516) dan garis sel 293 (ATCC CRL-1573) untuk membuat "virus pools" dan sel Vero (ATCC CCL-81) untuk titrasi infektivitas.

### X2 Metode Pemulihan Viral Alternatif dalam Protokol Uji

**X2.1** Pemulihan Metode *Glove Juice*— Dalam 5 menit pengolahan bahan uji, letakkan wadah steril, sarung tangan longgar yang mampu digunakan pada kedua tangan kanan dan kiri. Tambahkan 40 mL EBSS-pepton atau media elusi lainnya (dengan penetral jika diperlukan) pada masing-masing sarung tangan kencangkan sarung tangan tersebut di atas pergelangan tangan. Pijat seluruh permukaan masing-masing tangan selama satu menit dengan seragam dengan perhatian khusus diberikan pada area subungual. Kemudian keluarkan media elusi secara aseptik dari masing-masing sarung tangan, gabungkan eluat, dan pindahkan ke tabung steril dan analisis untuk virus menular. Tidak kurang dari 8 mL (~10 %) eluat harus diuji untuk mengetahui infektivitas virus.



## APPENDICES

(Nonmandatory Information)

### X1. VIRUSES AND THEIR HOST CELLS RECOMMENDED FOR USE IN THIS TEST PROTOCOL

**X1.1** The selection of the following test viruses is based on their (a) relative safety to the subjects as well as experimenters, (b) ability to grow to titers sufficiently high for testing, (c) ability to produce cytopathic effects or plaques, or both, in cell cultures, (d) potential to spread through contaminated hands, and (e) relative resistance to agents used in hygienic handwash and handrub agents. Other strains or types of viruses may be substituted provided they meet the above criteria.

**NOTE X1.1**—There is insufficient information on whether the passage history, culture conditions, and strain differences of viruses can influence the efficiency of their elimination by hygienic handwash agents. Therefore, caution must be exercised when substituting viruses as this may lead to variations in results from one laboratory to another.

**X1.2** Human Rotavirus Wa (ATCC VR-201 8) with CV-1 (ATCC CCL-70) or MA-104 (ATCC CRL-2378.1) cells as hosts. Prior to rotavirus inoculation, cell monolayers must be washed at least three times with EBSS or Phosphate Buffered Saline (PBS) to remove the serum from the growth or seeding medium. All diluents, maintenance media, and agar overlays (if applicable) must also be free from serum. Most rotaviruses also require the presence of trypsin in the medium for infection.

**X1.3** Human Rhinovirus Type 37 (ATCC VR-1147) or 14 (ATCC VR-284) and MRC-5 (ATCC CCL-171), H1-HeLa (ATCC CRL-1958), or WI-38 (ATCC CCL-75) cells for culture and infectivity assays.

**X1.4** Feline calicivirus (ATCC VR-782); the cell line recommended is CrFK (ATCC CCL-94). This virus is used as a surrogate for human norovirus.

**X1.5** Murine Norovirus (Washington University or other appropriate source); the cell line recommended is RAW 264.7 (ATCC TIB-71). This virus is used as another surrogate form human norovirus.

**X1.6** Human Adenovirus Type 5 (ATCC VR-1516) and cell line 293 (ATCC CRL-1573) for making virus pools and Vero cells (ATCC CCL-81) for infectivity titrations.

### X2. ALTERNATE VIRAL RECOVERY METHOD FOR USE IN THIS TEST PROTOCOL

**X2.1** Recovery of Virus-Glove Juice Method—Within 5 min of test substance treatment, place loose-fitting sterile disposable gloves on both the right and left hands. Add 40 mL of EBSS-peptone or other elution medium (with neutralizer if necessary) to each glove and secure the glove above the wrist. Massage all surfaces of each hand for one minute in a uniform manner with particular attention paid to the subungual areas.

Then remove the elution medium aseptically from each glove, combine the eluates, and transfer to a sterile tube and analyze for infectious virus. No less than 8 mL (~10 %) of the eluate shall be assayed for viral infectivity.



## Bibliografi

- [1] Ansari, S.A., Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., Wells, G.A. and Tostowaryk, W., "In vivo protocol for testing efficacy of handwashing agents against viruses & bacteria: Experiments with rotavirus & Escherichia coli," *Appl. Environ. Microbiol*, Vol 55, No. 12, 1989, pp. 3113–3118.
- [2] Sattar, S.A., Abebe, M., Bueti, A., Jampani, H., Newman, J., and Hua, S., "Activity of an alcohol-based hand gel against human adeno-, rhino-, and rotaviruses using the fingerpad method," *Infect. Control & Hosp. Epidemiol*, Vol 21, 2000, pp. 516–519.
- [3] *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5<sup>th</sup> Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C., CDC-NIH, 2010.
- [4] *Laboratory Biosafety Guidelines*, 3rd Edition, Health Canada, Ottawa, ON, Canada, 2004.
- [5] *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Diseases Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues*, NCCLS, 1998.
- [6] *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, N.J. Schmid and R.W. Emmons, Eds., 6th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C. 1989.
- [7] Blackwell, J.H., Chen, J.H.S., "Effects of Various Germicidal Chemicals, on Hepatitis 2 Cell Culture and Herpes Simplex Virus," *Journal of Association of Analytical Chemists*, Vol 53, 1970, pp. 1229–1236.
- [8] Bellamy, K., Alcock, R., Babb, J.R., Davies, S.G., and Ayliffe, G.A.J., "A Test for the Assessment of "Hygienic" Hand Disinfection Using Rotavirus," *Hospital Infec.*, Vol 24, pp. 201–210.
- [9] Casewell, M.W., Desai, N. "Survival of Multiply-Resistant *Klebsiella aerogenes* and other Gram-Negative Bacilli on Fingertips," *J. Hospital Infection*, Vol 4, 1983, pp. 350–360.



## Informasi pendukung terkait perumus standar

**[1] Komite Teknis Perumus SNI**

Komite Teknis 11-11 Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga

**[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis perumus SNI**

Ketua : : Beluh Mabasa Ginting

Wakil Ketua : : Augustine Zaini

Sekretaris : : Ihza Ihtimamul Umam

Anggota

1. Rini Sugiyati
2. Ira Setiawati
3. Fikrah Mawardya
4. Tono Eka Prayitno
5. Cahyani Retno Ariati
6. Rahmana Emran Kartasasimita
7. Anggiat Yonathan Amazia
8. Merryani Girsang
9. Aprisunadi
10. Toto Waluyadi
11. Dewi Ria Agustin
12. Lisa Amelia
13. Anggiat Yonathan Amazia

**[3] Konseptor rancangan SNI**

Gugus kerja di Sekretariat Komite Teknis 11-11 Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga

Tim Kerja Kesehatan – Direktorat Pengembangan Standar Agro, Kimia, Kesehatan, dan Penilaian Kesesuaian, Badan Standardisasi Nasional

**[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis perumus SNI**

Direktorat Pengembangan Standar Agro, Kimia, Kesehatan, dan Penilaian Kesesuaian Badan Standardisasi Nasional