

Disinfektan kimia dan antiseptik - Uji permukaan tidak berpori secara kuantitatif untuk evaluasi aktivitas *bactericidal* dan/atau *fungicidal* pada disinfektan kimia yang digunakan di bidang pangan, industri, domestik dan kelembagaan - Metode uji dan persyaratan tanpa perlakuan mekanik (fase 2, langkah 2)

Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative nonporous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)

(EN 13697:2015+A1:2019, IDT)

SNI ini merupakan adopsi identik dari EN 13697:2015+A1:2019 dan telah mendapat izin adopsi dari CEN, Rue de la Science 23 B – 1040 Brussels, Belgium

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
Pendahuluan.....	iv
1 Ruang lingkup	2
2 Acuan normatif.....	4
3 Istilah dan definisi	4
4 Persyaratan	4
5 Metode pengujian	8
5 Test method.....	9
Lampiran A_(informatif)_Strain referensi yang sesuai.....	52
Lampiran B(informatif)_Penetral	56
Lampiran C_(informatif)_Pernyataan hasil dengan pengenceran – metode netralisasi	60
Lampiran D_(informatif)_Aktivitas <i>bactericidal</i> di permukaan pada kondisi penggunaan umum (untuk kondisi bersih).....	64
Lampiran E_(informatif)_Ketepatan hasil uji.....	68
Bibliografi.....	70
Tabel 1 — Kondisi percobaan (1 dari 2).....	6
Tabel 1 — Kondisi percobaan (2 dari 2).....	8
Tabel C.1 — Hasil uji (1 dari 2)	60
Tabel C.1 — Hasil uji (2 dari 2)	62
Gambar 1 — Pembawa terinokulasi (<i>Inoculated carrier</i>)	34
Gambar 2 — Tampilan inokulum kering.....	34
Gambar 3 — Produk diaplikasikan di atas pembawa terinokulasi	36

Prakata

SNI EN 13697:2015+A1:2019, *Disinfektan kimia dan antiseptik - Uji permukaan tidak berpori secara kuantitatif untuk evaluasi aktivitas bactericidal dan/atau fungicidal pada disinfektan kimia yang digunakan di bidang pangan, industri, domestik dan kelembagaan - Metode uji dan persyaratan tanpa perlakuan mekanik (fase 2, langkah 2)*, merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari EN 13697:2015+A1:2019 *Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)*, dengan metode adopsi terjemahan dua bahasa dan ditetapkan oleh BSN pada tahun 2024.

Standar ini menggantikan SNI EN 13697:2015+A1:2019, *Disinfektan kimia dan antiseptik - Uji permukaan tidak berpori secara kuantitatif untuk evaluasi aktivitas bactericidal dan/atau fungicidal pada disinfektan kimia yang digunakan di bidang pangan, industri, domestik dan kelembagaan - Metode uji dan persyaratan tanpa perlakuan mekanik (fase 2, langkah 2)*, yang disusun dengan metode adopsi *republication-reprint* dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2020.

Dalam Standar ini istilah “*this International Standard*” pada standar EN 13697:2015+A1:2019 yang diadopsi diganti dengan “*this Standard*” dan diterjemahkan menjadi “Standar ini”.

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, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. SNI ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 14 Juni 2024 sampai dengan 28 Juni 2024 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Terdapat standar yang dijadikan sebagai acuan normatif dalam Standar ini telah diadopsi menjadi SNI, yaitu:

- EN 14885:2013, *Chemical disinfectants and antiseptics - Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics*, telah diadopsi dengan tingkat keselarasan identik menjadi SNI EN 14885:2013, *Disinfektan kimia dan antiseptik - Penerapan standar untuk disinfektan kimia dan antiseptik*.

Untuk menghindari kesalahan dalam penggunaan Standar ini, disarankan bagi pengguna standar menggunakan dokumen SNI yang dicetak dengan tinta berwarna (dapat mencantumkan kode tingkat warna Red Green Blue (RGB), atau kode tingkat warna Cyan Magenta Yellow Black (CMYK), atau kode tingkat warna lain jika diperlukan untuk cetak gambar dengan warna yang lebih akurat).”

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya, yaitu EN 13697:2015+A1:2019, 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.

Pendahuluan

Standar ini menjelaskan metode uji permukaan untuk menetapkan produk yang diusulkan sebagai disinfektan dalam bidang yang dijelaskan pada Pasal 1 yang memiliki atau tidak memiliki aktivitas *bactericidal* dan/atau *fungicidal* atau *yeasticidal* pada permukaan yang tidak berpori.

Standar ini sudah direvisi untuk memodifikasi zat pengganggu dalam "kondisi bersih" yang mengacu diterapkan pada *P. aeruginosa*; untuk memodifikasi perhitungan N, NC, NT, Nc, Na dan mempengaruhi pada hasil akhir serta untuk harmonisasi dengan standar CEN TC 216 terbaru lainnya.

Uji laboratorium memperhatikan simulasi kondisi praktis penerapannya dengan cermat. Kondisi yang dipilih (waktu kontak, suhu, organisme pada permukaan ...) mencerminkan parameter yang ditemukan dalam situasi praktis termasuk kondisi yang dapat mempengaruhi aksi dari disinfektan. Setiap konsentrasi penggunaan yang ditemukan dari uji ini sesuai dengan kondisi percobaan yang ditentukan.

Kondisi tersebut dimaksudkan untuk mencakup tujuan umum dan untuk memungkinkan acuan antara laboratorium dan jenis produk.

Akan tetapi, untuk beberapa penggunaan, rekomendasi penggunaan suatu produk dapat berbeda dan oleh karena itu kondisi pengujian tambahan perlu digunakan.

Introduction

This European Standard describes a surface test method for establishing whether a product proposed as a disinfectant in the fields described in Clause 1 has or does not have bactericidal and/or fungicidal or yeasticidal activity on non-porous surfaces. This European Standard has been revised in order to modify the interfering substance under “clean conditions” adopted for *P. aeruginosa*; in order to modify the calculation of N, NC, NT, Nc, Na and consequently the final results and to harmonize the standard with the other recent CEN TC 216 standards. The laboratory test closely simulates practical conditions of application. Chosen conditions (contact time, temperature, organisms on surfaces ...) reflect parameters which are found in practical situations including conditions which may influence the action of disinfectants. Each use concentration found from this test corresponds to defined experimental conditions. The conditions are intended to cover general purposes and to allow reference between laboratories and product types. However, for some applications the recommendations of use of a product can differ and therefore additional test conditions need to be used.

“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.”

Disinfektan kimia dan antiseptik - Uji permukaan tidak berpori secara kuantitatif untuk evaluasi aktivitas *bactericidal* dan/atau *fungicidal* pada disinfektan kimia yang digunakan di bidang pangan, industri, domestik dan kelembagaan - Metode uji dan persyaratan tanpa perlakuan mekanik (fase 2, langkah 2)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode uji (fase 2, langkah 2) dan persyaratan minimum untuk aktivitas *bactericidal* dan/atau *fungicidal* atau *yeasticidal* dari disinfektan kimia yang membentuk sediaan homogen dan stabil secara fisik saat diencerkan dengan air sadah, atau – untuk produk siap pakai – dengan air pada bidang pangan, industri, domestik dan kelembagaan, kecuali untuk bidang dan keadaan pada disinfeksi yang diindikasikan secara medis serta tidak termasuk produk yang digunakan pada jaringan hidup.

Ruang lingkup standar ini paling sedikitnya mencakup:

a) pengolahan, distribusi, dan ritel dari:

1) makanan dari produk hewan:

- i) susu dan produk susu;
- ii) daging dan produk daging;
- iii) ikan, makanan laut, dan produk yang terkait;
- iv) telur dan produk telur;
- v) makanan hewan;
- vi) dan lain sebagainya.

2) makanan dari produk nabati:

- i) minuman;
- ii) buah-buahan, sayuran dan turunannya (termasuk penyulingan gula);
- iii) tepung, penggilingan, dan pemanggangan;
- iv) makanan hewan;
- v) dan lain sebagainya.

b) bidang kelembagaan dan domestik:

- 1) usaha katering;
- 2) tempat umum;
- 3) transportasi publik;
- 4) sekolah;
- 5) penitipan anak;
- 6) toko;
- 7) ruang olahraga;
- 8) tempat limbah (sampah);
- 9) hotel;
- 10) tempat tinggal;
- 11) lingkungan rumah sakit yang tidak sensitif secara klinis;
- 12) kantor;
- 13) dan lain sebagainya.

Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)

1 Scope

This European Standard specifies a test method (phase 2/step 2) and the minimum requirements for bactericidal and/or fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants that form a homogeneous physically stable preparation in hard water or – in the case of ready-to-use products – with water in food, industrial, domestic and institutional areas, excluding areas and situations where disinfection is medically indicated and excluding products used on living tissues.

The scope of this European Standard applies at least to the following:

a) Processing, distribution and retailing of:

1) Food of animal origin:

- i) milk and milk products;
- ii) meat and meat products;
- iii) fish, seafood and products;
- iv) eggs and egg products;
- v) animal feeds;
- vi) etc.

2) Food of vegetable origin:

- i) beverages;
- ii) fruits, vegetables and derivatives (including sugar distillery);
- iii) flour, milling and backing;
- iv) animal feeds;
- v) etc.

b) Institutional and domestic areas:

- 1) catering establishments;
- 2) public areas;
- 3) public transports;
- 4) schools;
- 5) nurseries;
- 6) shops;
- 7) sports rooms;
- 8) waste container (bins);
- 9) hotels;
- 10) dwellings;
- 11) clinically non sensitive areas of hospitals;
- 12) offices;
- 13) etc.

c) bidang industri lainnya:

- 1) bahan kemasan;
- 2) bioteknologi (*yeast*, protein, enzim...);
- 3) obat;
- 4) kosmetik dan perlengkapan mandi;
- 5) tekstil;
- 6) industri antariksa, industri komputer;
- 7) dan lain sebagainya.

Dengan menggunakan standar ini, dimungkinkan untuk menentukan aktivitas *bactericidal* atau *fungicidal* atau *yeasticidal* dari produk yang tidak diencerkan. Ketika tiga konsentrasi diuji, dalam rentang aktif sampai non aktif, disyaratkan pengenceran produk, sehingga produk membentuk sediaan stabil yang homogen dalam air sadah.

EN 14885 menetapkan secara rinci hubungan berbagai pengujian satu sama lain dan untuk rekomendasi penggunaan.

CATATAN 1 Metode yang dijelaskan dimaksudkan untuk menentukan aktivitas formulasi komersial atau zat aktif pada bakteri dan/atau fungi dalam kondisi penggunaannya.

CATATAN 2 Metode ini tidak dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas produk terhadap *mycobacteria*.

2 Acuan normatif

Dokumen berikut, secara keseluruhan atau sebagian, secara normatif diacu dalam dokumen ini dan sangat diperlukan untuk penerapannya. Untuk acuan bertanggung, hanya edisi yang dikutip yang berlaku. Untuk acuan yang tidak bertanggung, edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amandemennya) yang berlaku.

EN 12353, *Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity*

EN 14885, *Chemical disinfectants and antiseptics — Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics*

ISO 4793, *Laboratory sintered (fritted) filters — Porosity grading, classification and designation*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, berlaku istilah dan definisi yang diberikan dalam EN 14885.

4 Persyaratan

Produk harus menunjukkan paling sedikit reduksi 4 lg desimal untuk bakteri dan paling sedikit reduksi 3 lg desimal untuk fungi, ketika diuji sesuai dengan Tabel 1 dan 5.5.1.

- c) Other industrial areas:
- 1) packaging material;
 - 2) biotechnology (yeast, proteins, enzymes...);
 - 3) pharmaceutical;
 - 4) cosmetics and toiletries;
 - 5) textiles;
 - 6) space industry, computer industry;
 - 7) etc.

Using this European Standard, it is possible to determine the bactericidal or fungicidal or yeasticidal activity of the undiluted product. As three concentrations are tested, in the active to non active range, dilution of the product is required and, therefore, the product forms a homogeneous stable preparation in hard water.

EN 14885 specifies in detail the relationship of the various tests to one another and to use recommendations.

NOTE 1 The method described is intended to determine the activity of commercial formulations or active substances on bacteria and/or fungi in the conditions in which they are used.

NOTE 2 This method cannot be used to evaluate the activity of products against mycobacteria.

2 Normative references

The following documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

EN 12353, Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity

EN 14885, Chemical disinfectants and antiseptics — Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics

ISO 4793, Laboratory sintered (fritted) filters — Porosity grading, classification and designation

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the terms and definitions given in EN 14885 apply.

4 Requirements

The product shall demonstrate at least a 4 decimal log (lg) reduction for bacteria and at least A 3 decimal log (lg) reduction for fungi, when tested in accordance with Table 1 and 5.5.1.

Tabel 1 — Kondisi percobaan (1 dari 2)

Kondisi uji	Aktivitas <i>bactericidal</i> pada permukaan yang tidak berpori tanpa tindakan mekanis	Aktivitas <i>yeasticidal</i> pada permukaan yang tidak berpori tanpa tindakan mekanis	Aktivitas <i>fungicidal</i> pada permukaan yang tidak berpori tanpa tindakan mekanis
Organisme uji (lihat 5.2.1) spektrum minimum organisme uji	<i>Enterococcus hirae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>
Organisme uji tambahan (contoh)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (untuk produsen bir) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (untuk produsen bir)	Semua organisme uji yang relevan
Suhu pengujian	Dalam rentang dari (4 ± 1) °C hingga (40 ± 1) °C Untuk pengujian yang dilakukan pada suhu kamar, harus dalam rentang antara 18°C dan 25°C	Dalam rentang dari (4 ± 1)°C hingga (40 ± 1)°C Untuk pengujian yang dilakukan pada suhu kamar, harus dalam rentang antara 18°C dan 25°C	Dalam rentang dari (4 ± 1)°C hingga (40 ± 1)°C Untuk pengujian yang dilakukan pada suhu kamar, harus dalam rentang antara 18°C dan 25°C
Waktu kontak	dalam rentang dari 1 menit hingga 60 menit (dari 1 menit hingga 5 menit dengan interval 1 menit dan dari 5 menit hingga 60 menit dengan interval 5 menit)	dalam rentang dari 1 menit hingga 60 menit (dari 1 menit hingga 5 menit dengan interval 1 menit dan dari 5 menit hingga 60 menit dengan interval 5 menit)	dalam rentang dari 1 menit hingga 60 menit (dari 1 menit hingga 5 menit dengan interval 1 menit dan dari 5 menit hingga 60 menit dengan interval 5 menit)
Zat pengganggu pada kondisi bersih	0,3 g/l <i>bovine albumin</i> untuk <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Escherichia coli</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3 g/l <i>bovine albumin</i> untuk <i>C. albicans</i>	0,3 g/l <i>bovine albumin</i> untuk <i>C. albicans</i> dan <i>A. brasiliensis</i>

Table 1 — Experimental conditions (1 of 2)

Test conditions	Bactericidal activity on non-porous surfaces without mechanical action	Yeasticidal activity on non-porous surfaces without mechanical action	Fungicidal activity on non-porous surfaces without mechanical action
Test organisms (see 5.2.1) minimum spectrum of test organisms	<i>Enterococcus hirae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>
Test organisms additional (examples)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (for breweries) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (for breweries)	any relevant test organism
Test temperature	In a range from $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ to $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ For tests performed at room temperature, the range shall be between $18 ^\circ\text{C}$ and $25 ^\circ\text{C}$	In a range from $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ to $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ For tests performed at room temperature, the range shall be between $18 ^\circ\text{C}$ and $25 ^\circ\text{C}$	In a range from $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ to $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ For tests performed at room temperature, the range shall be between $18 ^\circ\text{C}$ and $25 ^\circ\text{C}$
Contact time	in a range from 1 min to 60 min (from 1 min to 5 min at intervals of 1 min and from 5 min to 60 min at intervals of 5 min)	in a range from 1 min to 60 min (from 1 min to 5 min at intervals of 1 min and from 5 min to 60 min at intervals of 5 min)	in a range from 1 min to 60 min (from 1 min to 5 min at intervals of 1 min and from 5 min to 60 min at intervals of 5 min)
Interfering substance clean conditions	0,3 g/l bovine albumin for <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3 g/l bovine albumin for <i>C. albicans</i>	0,3 g/l bovine albumin for <i>C. albicans</i> and <i>A. brasiliensis</i>

Tabel 1 — Kondisi percobaan (2 dari 2)

Kondisi uji	Aktivitas <i>bactericidal</i> pada permukaan yang tidak berpori tanpa aksi mekanis	Aktivitas <i>yeasticidal</i> pada permukaan yang tidak berpori tanpa tindakan mekanis	Aktivitas <i>fungicidal</i> pada permukaan yang tidak berpori tanpa tindakan mekanis
Zat pengganggu pada kondisi kotor	3,0 g/l bovin albumin untuk <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Escherichia coli</i>	3,0 g/l bovine albumin untuk <i>C. albicans</i>	3,0 g/l bovine albumin untuk <i>C. albicans</i> dan <i>A. brasiliensis</i>
Zat pengganggu tambahan	semua zat yang relevan	semua zat yang relevan	semua zat yang relevan
reduksi lg dari kontrol air (lg desimal)	≥ 4 lg	≥ 3 lg	≥ 3 lg

Kondisi uji yang diacu (Tujuan umum) tidak dimaksudkan sebagai persyaratan penggunaan produk, atau sebagai persyaratan untuk evaluasi dan penerimaan produk melalui peraturan pemerintah.

Waktu penggunaan produk ditetapkan oleh produsen.

Jika penggunaan khusus perlu dipertimbangkan, aktivitas *bactericidal/yeasticidal/fungicidal* ditentukan sebagai tambahan pada kondisi yang relevan sesuai dengan waktu penggunaan, suhu, *strain* dan zat pengganggu.

5 Metode pengujian

5.1 Prinsip

Suspensi uji bakteri atau fungi dalam larutan zat pengganggu diinokulasi ke permukaan *stainless steel* uji dan dikeringkan. Sampel yang disiapkan dari produk yang diuji digunakan dengan cara menutupi lapisan kering. Permukaan dipertahankan pada suhu tertentu untuk jangka waktu tertentu. Permukaan dipindahkan ke media netralisasi yang telah divalidasi sebelumnya sehingga aksi disinfektan segera dinetralkan. Jumlah organisme yang bertahan hidup dapat diperoleh kembali (*recovered*) dari permukaan ditentukan secara kuantitatif.

Jumlah bakteri atau fungi pada permukaan yang diperlakukan dengan air sadah sebagai pengganti disinfektan juga ditentukan dan pengurangan jumlah *viable* yang dikaitkan dengan produk dihitung berdasarkan perbedaan.

Table 1 — Experimental conditions (2 of 2)

Test conditions	Bactericidal activity on non-porous surfaces without mechanical action	Yeasticidal activity on non-porous surfaces without mechanical action	Fungicidal activity on non-porous surfaces without mechanical action
Interfering substance dirty conditions	3,0 g/l bovine albumin for <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Escherichia coli</i>	3,0 g/l bovine albumin for <i>C. albicans</i>	3,0 g/l bovine albumin for <i>C. albicans</i> and <i>A. brasiliensis</i>
Interfering substance additional	any relevant substance	any relevant substance	any relevant substance
Log reduction from a water control (decimal lg)	≥ 4 lg	≥ 3 lg	≥ 3 lg
<p>The referenced test conditions (General purposes) are by no means intended as requirements for the use of a product, nor as requirements for the evaluation and acceptance of products by regulatory authorities.</p> <p>The application time for the product is specified by the manufacturer.</p> <p>If specific applications have to be considered, the bactericidal/yeasticidal/fungicidal activity has to be determined additionally under relevant conditions concerning application time, temperature, strains and Interfering Substances.</p>			

5 Test method

5.1 Principle

A test suspension of bacteria or fungi in a solution of interfering substances is inoculated onto a test stainless steel surface and dried. A prepared sample of the product under test is applied in a manner which covers the dried film. The surface is maintained at a specified temperature for a defined period of time. The surface is transferred to a previously validated neutralization medium so that the action of the disinfectant is immediately neutralized. The number of surviving organisms which can be recovered from the surface is determined quantitatively.

The number of bacteria or fungi on a surface treated with hard water in place of the disinfectant is also determined and the reduction in viable counts attributed to the product is calculated by difference

5.2 Bahan dan reagen

5.2.1 Organisme uji

Aktivitas *bactericidal* harus dievaluasi menggunakan empat *strain* berikut:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15 442¹⁾;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6 538;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10 541;
- *Escherichia coli* ATCC 10536.

Aktivitas *fungicidal* atau *yeasticidal* harus dievaluasi dengan menggunakan dua *strain* berikut :

- *Candida albicans* ATCC 10231;
- *Aspergillus brasiliensis* (cth. *A. niger*) ATCC 16404.

Jika diperlukan untuk penerapan tertentu, *strain* tambahan dapat dipilih dari, misalnya:

- *Salmonella typhimurium* ATCC 13 311;
- *Lactobacillus brevis* DSM 6 235;
- *Enterobacter cloacae* DSM 6 234;
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9 763 atau DSM 1333;
(untuk produsen bir) atau
- *Saccharomyces cerevisiae* DSM 70487.
var. diastaticus (untuk produsen bir)

CATATAN Lihat Lampiran A untuk jumlah *strain* yang sesuai di beberapa koleksi kultur lainnya.

Jika *strain* tambahan digunakan, *strain* tersebut harus diinkubasi dalam kondisi pertumbuhan optimal (suhu, waktu, lingkungan) dan dicatat dalam laporan pengujian.

Jika *strain* tambahan yang dipilih tidak sesuai dengan *strain* yang ditentukan, maka kesesuaiannya untuk memberikan *inokula* dengan konsentrasi yang cukup harus diverifikasi. Jika *strain* tambahan yang diuji tidak diklasifikasikan di pusat acuan, maka karakteristik identifikasinya harus disebutkan. Sebagai tambahan, *strain* harus disimpan oleh laboratorium uji atau kultur nasional sebagai acuan selama 5 tahun.

5.2.2 Media kultur dan reagen

5.2.2.1 Umum

Reagen harus memiliki *analytical grade* dan/atau sesuai untuk tujuan mikrobiologi.

¹⁾ ATCC 15 442, ATCC 6 538, ATCC 10 541, ATCC 10 536, ATCC 10 231, ATCC 16 404 dan ATCC 13311 adalah sejumlah *strain* yang disuplai oleh *American Type Culture Collections*. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna standar ini dan bukan merupakan dukungan CEN terhadap produk yang disebutkan. Produk yang setara dapat digunakan jika dapat ditunjukkan untuk memberikan hasil yang sama.

5.2 Materials and reagents

5.2.1 Test organisms

The bactericidal activity shall be evaluated using the following four strains:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15 442¹⁾ ;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6 538;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10 541;
- *Escherichia coli* ATCC 10 536.

The fungicidal or yeasticidal activity shall be evaluated using the following two strains.

- *Candida albicans* ATCC 10 231;
- *Aspergillus brasiliensis* (ex *A. niger*) ATCC 16 404.

If required for specific applications, additional strains may be chosen from, for example:

- *Salmonella typhimurium* ATCC 13 311;
- *Lactobacillus brevis* DSM 6 235;
- *Enterobacter cloacae* DSM 6 234;
- *Saccharomyces cerevisiae* (for breweries) or ATCC 9 763 or DSM 1 333;
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* DSM 70 487.
(for breweries)

NOTE See Annex A for corresponding strain numbers in some other culture collections.

If additional strains are used, they shall be incubated under optimum growth conditions (temperature, time, atmosphere) and noted in the test report.

If the additional strains selected do not correspond to the specified strains, their suitability for supplying inocula of sufficient concentration shall be verified. If the additional strains tested are not classified at a reference centre, their identification characteristics shall be stated. In addition, they shall be held by the testing laboratory or national culture under a reference for 5 years

5.2.2 Culture media and reagents

5.2.2.1 General

The reagents shall be of analytical grade and/or appropriate for microbiological purposes.

¹⁾ ATCC 15 442, ATCC 6 538, ATCC 10 541, ATCC 10 536, ATCC 10 231, ATCC 16 404 and ATCC 13311 are the collection numbers of strains supplied by the American Type Culture Collections. This information is given for the convenience of users of this standard and does not constitute an endorsement by CEN of the product named. Equivalent products can be used if they can be shown to lead to the same results

5.2.2.2 Air

Air harus bebas dari zat yang bersifat racun atau menghambat bakteri dan fungi. Air harus berupa air suling kaca segar (*freshly glass distilled*) dan bukan air demineralisasi.

Sterilkan dalam autoklaf (lihat 5.3.2.1 a).

CATATAN 1 Jika air disterilkan pada waktu sterilisasi reagen, maka hal ini tidak perlu dilakukan.

CATATAN 2 Jika air suling dengan kualitas yang memadai tidak tersedia, air untuk sediaan injeksi (lihat *European Pharmacopoeia*) dapat digunakan.

5.2.2.3 Tryptone Soya Agar (TSA)

Untuk pemeliharaan *strain* bakteri dan kinerja jumlah *viable*:

<i>Tryptone, pancreatic digest of casein</i>	15,0 g
<i>Soya peptone, papaic digest of Soybean meal</i>	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Air (lihat 5.2.2.2)	1.000,0 ml

Sterilkan dalam autoklaf (5.3.2.1 a). Setelah sterilisasi, pH media harus setara dengan $7,2 \pm 0,2$ bila diukur pada 20°C .

5.2.2.4 Malt extract agar (MEA)

Untuk pemeliharaan *strain* fungi, sporulasi dan kinerja jumlah *viable*:

<i>Malt extract</i> (tara pangan, contoh bubuk <i>Cristomalt</i> dari <i>Difal</i>)	30,0 g
Agar	15,0 g
Air (lihat 5.2.2.2)	1.000,0 ml

Malt extract sebaiknya tara pangan (*food grade*) (contoh bubuk *Cristomalt* dari *Difal*) atau yang setara bukan yang sangat murni dan tidak hanya berdasarkan maltosa (seperti *Malt extract* dari OXOID)²⁾. Namun jika terdapat masalah paling sedikit memproduksi 75 % spora berduri lihat 5.4.1.4.2

Sterilkan dalam autoklaf [5.3.2.1a)]. Setelah sterilisasi, pH media harus setara dengan $5,6 \pm 0,2$ bila diukur pada $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.

Jika mengalami masalah dengan netralisasi (5.5.2.3 dan 5.5.2.4), mungkin perlu menambahkan penetral ke MEA. Lampiran B memberikan panduan tentang penetral yang dapat digunakan.

²⁾ Informasi ini diberikan demi kenyamanan pengguna Standar ini dan bukan merupakan dukungan oleh CEN dari produk bernama. Produk yang setara dapat digunakan jika terbukti memberikan hasil yang sama.

5.2.2.2 Water

The water shall be free from substances that are toxic or inhibiting to bacteria and fungi. It shall be freshly glass distilled and not demineralized water.

Sterilize in the autoclave (see 5.3.2.1 a).

NOTE 1 If the water is sterilized during sterilization of the reagents, this is not necessary.

NOTE 2 If distilled water of adequate quality is not available, water for injectable preparation (see European Pharmacopoeia) can be used.

5.2.2.3 Tryptone Soya Agar (TSA)

For maintenance of bacterial strains and performance of viable counts:

Tryptone, pancreatic digest of casein	15,0 g
Soya peptone, papaic digest of Soybean meal	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Water (see 5.2.2.2)	1.000,0 ml

Sterilize in the autoclave (5.3.2.1 a). After sterilization the pH of the medium shall be equivalent to $7,2 \pm 0,2$ when measured at 20 °C.

5.2.2.4 Malt extract agar (MEA)

For maintenance of fungal strains, sporulation and performance of viable counts

Malt extract (food grade, e.g. Cristomalt powder from Difal)	30,0 g
Agar	15,0 g
Water (see 5.2.2.2)	1.000,0 ml

The malt extract should be food grade (e.g. Cristomalt powder from Difal) or equivalent that is not highly purified and not only based on maltose (e.g. Malt extract from OXOID)²⁾. However, if there are problems producing at least 75 % spiny spores see 5.4.1.4.2.

Sterilize in the autoclave [5.3.2.1a)]. After sterilization, the pH of the medium shall be equivalent to $5,6 \pm 0,2$ when measured at (20 ± 1) °C.

In case of encountering problems with neutralization (5.5.2.3 and 5.5.2.4), it may be necessary to add neutralizer to the MEA. Annex B gives guidance on the neutralizers that may be used.

²⁾ This information is given for the convenience of users of this standard and does not constitute an endorsement by CEN of the product named. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results

5.2.2.5 Pengencer

Larutan *Tryptone sodium* klorida:

<i>Tryptone, pancreatic digest of casein</i>	1,0 g
NaCl	8,5 g
Air (lihat 5.2.2.2)	1.000,0 ml

Sterilkan dalam autoklaf (lihat 5.3.2.1). Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ bila diukur pada 20°C .

5.2.2.6 Penetral

Penetral harus divalidasi untuk produk yang diuji sesuai dengan 5.5.2.3 dan 5.5.2.4. Penetral harus steril.

CATATAN Informasi penetral yang sesuai untuk beberapa kategori produk terdapat pada Lampiran B.

5.2.2.7 Air sadah untuk pengenceran produk

Air sadah untuk pengenceran produk harus disiapkan sebagai berikut:

- larutan A: Larutkan 19,84 g MgCl_2 anhidrat dan 46,24 g CaCl_2 anhidrat dalam air (lihat 5.2.2.2) dan encerkan menjadi 1.000 ml. Sterilkan dengan filtrasi membran (5.3.2.19) atau dalam autoklaf (5.3.2.1 a). Autoklaf - jika digunakan - dapat menyebabkan hilangnya cairan. Dalam hal ini, buat hingga 1.000 ml dengan air (5.2.2.2) dalam kondisi aseptik. Simpan larutan di refrigerator (5.3.2.15) tidak lebih dari satu bulan;
- larutan B: Larutkan 35,02 g NaHCO_3 dalam air (lihat 5.2.2.2) dan encerkan menjadi 1.000 ml. Sterilkan dengan filtrasi membran (5.3.2.19). Simpan larutan di refrigerator (5.3.2.15) tidak lebih dari satu minggu;

Tambahkan minimum 600 ml air (lihat 5.2.2.2) ke 6,0 ml larutan A dalam labu ukur 1.000 ml, kemudian tambahkan 8,0 ml larutan B. Campur dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan air (lihat 5.2.2.2).

Sterilkan dengan melewatkannya pada filter dengan ukuran pori efektif maksimum $0,45 \mu\text{m}$.

pH air sadah harus $7,0 \pm 0,2$, jika diukur pada $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ (5.3.2.6). Jika perlu, sesuaikan pH dengan menggunakan larutan sekitar 40 g/l (sekitar 1 mol/l) natrium hidroksida (NaOH) atau sekitar 36,5 g/l (sekitar 1 mol/l) asam klorida (HCl).

Air sadah harus baru disiapkan dalam kondisi aseptik dan digunakan dalam 12 jam.

CATATAN Saat menyiapkan Larutan produk uji (5.4.2), penambahan produk ke dalam air sadah menghasilkan kesadahan air akhir yang berbeda yang dinyatakan sebagai kalsium karbonat (CaCO_3) di setiap tabung reaksi. Pada situasi apapun, kesadahan akhir adalah lebih rendah dari 375 mg/l kalsium karbonat.

5.2.2.5 Diluent

Tryptone sodium chloride solution:

Tryptone, pancreatic digest of casein	1,0 g
NaCl	8,5 g
Water (see 5.2.2.2)	1.000,0 ml

Sterilize in the autoclave (see 5.3.2.1). After sterilization the pH shall be equivalent to $7,0 \pm 0,2$ when measured at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.2.2.6 Neutralizer

The neutralizer shall be validated for the product under test in accordance with 5.5.2.3 and 5.5.2.4. The neutralizer shall be sterile.

NOTE Information on neutralizers that have been found to be suitable for some categories of products is given in Annex B.

5.2.2.7 Hard water for dilution of products

Hard water for dilution of products shall be prepared as follows:

- solution A: Dissolve 19,84 g anhydrous MgCl_2 and 46,24 g anhydrous CaCl_2 in water (see 5.2.2.2) and dilute to 1.000 ml. Sterilize by membrane filtration (5.3.2.19) or in the autoclave (5.3.2.1 a). Autoclaving – if used - may cause a loss of liquid. In this case, make up to 1.000 ml with water (5.2.2.2) under aseptic conditions. Store the solution in the refrigerator (5.3.2.15) for no longer than one month;
- solution B: Dissolve 35,02 g NaHCO_3 in water (see 5.2.2.2) and dilute to 1.000 ml. Sterilize by membrane filtration (5.3.2.19). Store the solution in the refrigerator (5.3.2.15) for no longer than one week;

Add at least 600 ml water (see 5.2.2.2) to 6,0 ml of solution A in a 1.000 ml volumetric flask, then add 8,0 ml solution B. Mix and dilute to 1.000 ml with water (see 5.2.2.2).

Sterilize by passing through a filter with a maximum effective pore size of $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

The pH of the hard water shall be $7,0 \pm 0,2$, when measured at $(20 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5.3.2.6). If necessary, adjust the pH by using a solution of approximately 40 g/l (about 1 mol/l) of sodium hydroxide (NaOH) or approximately 36,5 g/l (about 1 mol/l) of hydrochloric acid (HCl).

The hard water shall be freshly prepared under aseptic conditions and used within 12 h.

NOTE When preparing the test product solutions (5.4.2), the addition of the product to the hard water produces a different final water hardness expressed as calcium carbonate (CaCO_3) in each test tube. In any case, the final hardness is lower than 375 mg/l of calcium carbonate.

5.2.2.8 Zat pengganggu

5.2.2.8.1 Umum

Zat pengganggu harus dipilih berdasarkan kondisi penggunaan yang ditetapkan bagi produk.

Zat pengganggu harus steril dan disiapkan pada 2 kali dari konsentrasi akhir dalam pengujian.

Untuk zat pengganggu tambahan, komposisi ionik (misalnya pH, kesadahan kalsium dan/atau magnesium) dan komposisi kimia (misalnya zat mineral, protein, karbohidrat, lipid, detergen) harus sepenuhnya ditentukan.

CATATAN Istilah “zat pengganggu” digunakan bahkan jika terdapat lebih dari satu zat.

Metode persiapan dan sterilisasi dan komposisi harus dicatat dalam laporan pengujian (lihat 5.7).

5.2.2.8.2 Larutan *bovine albumin*

Larutan *bovine albumin* untuk kondisi pengujian harus disiapkan sebagai berikut:

- Persiapan untuk kondisi bersih:
 - larutkan 0,06 g *bovine albumin* (*Cohn fraction V* untuk *Dubos medium*) dalam 100 ml air (lihat 5.2.2.2);
 - sterilkan dengan filtrasi membran 0,45 µm (lihat 5.3.2.19), simpan di refrigerator dan gunakan dalam waktu satu bulan.

Konsentrasi akhir *bovine albumin* dalam prosedur pengujian (lihat 5.5.2) adalah 0,3 g/l.

- Persiapan untuk kondisi kotor:
 - larutkan 0,6 g *bovine albumin* (fraksi *Cohn V* untuk *Dubos medium*) dalam 100 ml air (lihat 5.2.2.2);
 - sterilkan dengan filtrasi membran 0,45 µm (lihat 5.3.2.19), simpan di refrigerator dan gunakan dalam waktu satu bulan.

Konsentrasi akhir *bovine albumin* dalam prosedur pengujian (lihat 5.5.2) adalah 3,0 g/l.

5.2.2.8.3 Susu (produk susu, ...)

Susu skim (skimmed milk), harus dijamin bebas antibiotik maupun zat tambahan dan direkonstitusi dengan takaran 100 g bubuk per liter air (5.2.2.2). Larutan uji harus disiapkan sebagai berikut:

- siapkan larutan 2,0% (V/V) dalam air (lihat 5.2.2.2) dengan menambahkan 2 bagian susu yang telah direkonstitusi ke dalam 98 bagian air;
- sterilkan selama 30 menit pada 105°C ± 3°C (atau 5 menit pada 121°C ± 3°C).

Konsentrasi akhir susu yang direkonstitusi harus 1,0% (v/v) dalam pengujian (lihat 5.5.2) atau 1 g/l susu bubuk selama pengujian.

5.2.2.8 Interfering substance

5.2.2.8.1 General

The interfering substance shall be chosen according to the conditions of use laid down for the product.

The interfering substance shall be sterile and prepared at 2 times its final concentration in the test.

For the additional interfering substances, the ionic composition (e.g. pH, calcium and/or magnesium hardness) and chemical composition (e.g. mineral substances, protein, carbohydrates, lipids, detergents) shall be fully defined.

NOTE The term “interfering substance” is used even if it contains more than one substance.

The method of preparation and sterilization together with the composition shall be noted in the test report (see 5.7).

5.2.2.8.2 Bovine albumin solutions

Bovine albumin solutions for the test conditions shall be prepared as follows:

- Preparation for clean conditions:
 - dissolve 0,06 g of bovine albumin (Cohn fraction V for Dubos medium) in 100 ml of water (see 5.2.2.2);
 - sterilize by 0,45 µm membrane filtration (see 5.3.2.19), keep in the refrigerator and use within one month.

The final concentration of bovine albumin in the test procedure (see 5.5.2) is 0,3 g/l.

- Preparation for dirty conditions:
 - dissolve 0,6 g of bovine albumin (Cohn fraction V for Dubos medium) in 100 ml of water (see 5.2.2.2);
 - sterilize by 0,45 µm membrane filtration (see 5.3.2.19), keep in the refrigerator and use within one month.

The final concentration of bovine albumin in the test procedure (see 5.5.2) is 3,0 g/l.

5.2.2.8.3 Milk (dairies,...)

Skimmed milk, guaranteed free of antibiotics and additives and reconstituted at a rate of 100 g powder per litre of water (5.2.2.2), shall be prepared as follows:

- prepare a solution of 2,0 % (V/V) in water (see 5.2.2.2) by adding 2 parts of reconstituted milk to 98 parts of water;
- sterilize for 30 min at 105 °C ± 3 °C (or 5 min at 121 °C ± 3 °C).

The final concentration of the reconstituted milk should be 1,0 % (v / v) in the test (see 5.5.2) or 1 g/l of milk powder during the test.

5.2.3 Permukaan Uji

Cakram *stainless steel* (cakram berdiameter 2 cm) 304 dengan lapisan akhir mutu 2b di kedua sisi. Permukaannya harus rata.

Permukaan hanya boleh digunakan sekali.

Sebelum digunakan, permukaan harus ditempatkan dalam gelas kimia (ukuran minimum: 50 ml) yang berisi tidak kurang dari 20 ml larutan Decon® 5% (V/V)³⁾ selama 60 menit. Segera bilas cakram dengan air suling segar selama 10 detik.

Permukaan tidak boleh kering. Cakram hanya boleh dipegang menggunakan penjepit. Bilas lagi cakram dengan air (lihat 5.2.2.2) selama 10 detik untuk memastikan seluruh surfaktan terbilas sempurna. Untuk memasok aliran air yang memadai, wadah bertekanan yang mengeluarkan cairan steril dengan selang dan konektor yang sesuai atau metode lain yang sesuai dapat digunakan dan diatur untuk memasok kira-kira 2.000 ml per menit. Untuk mensterilkan, letakkan cakram bersih di dalam cawan berisi iso-propanol 70% (V/V) selama 15 menit. Keluarkan cakram dan keringkan dengan penguapan di bawah *laminar air flow*.

5.3 Peralatan dan alat gelas

5.3.1 Umum

Sterilkan semua alat gelas dan bagian dari peralatan yang kontak dengan media kultur dan reagen atau sampel, kecuali peralatan yang dipasok dengan kondisi steril, menggunakan salah satu dari beberapa metode berikut:

- dalam autoklaf (lihat 5.3.2.1) dengan mempertahankannya pada suhu 121^{+3}_0 °C untuk waktu penahanan minimum 15 menit;
- dalam pensteril panas kering (lihat 5.3.2.1) dengan mempertahankannya pada suhu 180°C untuk waktu penahanan minimum 30 menit, pada suhu 170°C untuk waktu penahanan minimum 1 jam atau pada suhu 160°C untuk penahanan minimum waktu 2 jam.

5.3.2 Peralatan laboratorium mikrobiologi yang lazim⁴⁾ dan khususnya, seperti berikut:

5.3.2.1 Peralatan untuk sterilisasi:

- untuk sterilisasi panas lembab, autoklaf yang mampu dipertahankan pada suhu (121^{+3}_0) °C selama 15 menit;
- untuk sterilisasi panas kering, udara panas oven yang mampu dipertahankan pada suhu 180°C untuk waktu penahanan minimum 30 menit, pada 170°C untuk waktu penahanan minimum 1 jam atau pada 160°C untuk waktu penahanan minimum 2 jam.

5.3.2.2 Kabinet dengan suhu terkendali yang dapat diatur pada suhu uji, $(\theta \pm 1)$ °C

5.3.2.3 *Penangas air*, dapat diatur pada suhu $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, pada suhu $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ dan pada suhu uji tambahan $\theta \pm 1$ °C (lihat 5.5.1).

³⁾ Decon® adalah contoh produk cocok yang tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna standar ini dan bukan merupakan dukungan CEN terhadap produk ini.

⁴⁾ Peralatan sekali pakai merupakan alternatif yang dapat diterima dibandingkan *glassware* yang dapat digunakan kembali.

5.2.3 Test surface

Stainless steel discs (2 cm diameter discs) 304 with grade 2b finish on both sides. The surfaces should be flat.

The surfaces should be used only once.

Prior to use the surfaces should be placed in a beaker (minimum size: 50 ml) containing not less than 20 ml of 5 % (V/V) Decon®³⁾ for 60 min. Immediately rinse the discs with running freshly distilled water for 10 s.

The surface shall not be allowed to dry to any extent. The discs shall only be handled with forceps. Rinse the discs with water (see 5.2.2.2) for a further 10 s to ensure complete removal of the surfactant. To supply a satisfactory flow of water, a sterilized fluid dispensing pressure vessel with suitable hose and connectors or other suitable method can be used and regulated to supply approximately 2 000 ml per min. To sterilize, place the clean disc in a bath containing 70 % (V/V) iso-propanol for 15 min. Remove the disc and dry by evaporation under laminar air flow.

5.3 Apparatus and glassware

5.3.1 General

Sterilize all glassware and parts of the apparatus that will come into contact with the culture media and reagents or the sample, except those which are supplied sterile, by one of the following methods:

- a) in the autoclave (see 5.3.2.1) by maintaining it at 121^{+3}_0 °C for a minimum holding time of 15 min;
- b) in the dry heat sterilizer (see 5.3.2.1) by maintaining it at 180 °C for a minimum holding time of 30 min, at 170 °C for a minimum holding time of 1 h or at 160 °C for a minimum holding time of 2 h.

5.3.2 Usual microbiological laboratory equipment ⁴⁾ and, in particular, the following:

5.3.2.1 Apparatus for sterilization:

- c) for moist heat sterilization, an autoclave capable of being maintained at (121^{+3}_0) °C for 15 min;
- d) for dry heat treatment, a hot air oven capable of being maintained at 180 °C for a minimum holding time of 30 min, at 170 °C for a minimum holding time of 1 h or at 160 °C for a minimum holding time of 2 h.

5.3.2.2 Temperature controlled cabinet capable of being controlled at test temperatures, ($\theta \pm 1$) °C

5.3.2.3 Water baths, capable of being controlled at 20 °C \pm 1 °C, at 45 °C \pm 1 °C and at additional test temperatures $\theta \pm 1$ °C (see 5.5.1).

³⁾ Decon® is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this standard and does not constitute an endorsement by CEN of this product

⁴⁾ Disposable equipment is an acceptable alternative to reusable glassware.

- 5.3.2.4 Inkubator**, (untuk aktivitas *bactericidal*), dapat diatur pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ atau suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Inkubator pada suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dapat digunakan jika inkubator pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ tidak tersedia.
- 5.3.2.5 Inkubator** (untuk aktivitas *fungicidal* atau *yeasticidal*), mampu diatur pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 5.3.2.6 pH-meter**, memiliki akurasi kalibrasi 0,1 skala pH pada suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 5.3.2.7 Stopwatch**
- 5.3.2.8 Vortex mixer** (pengocok mekanis atau pengaduk elektromekanis, yaitu Vortex® mixer⁹⁾).
- 5.3.2.9 Wadah**: Tabung reaksi, botol atau labu kultur dengan kapasitas yang sesuai.
- 5.3.2.10 Pipet ukur**, dengan kapasitas nominal 10 ml, 1 ml, 0,1 ml dan 0,05 ml, atau pipet otomatis yang terkalibrasi
- 5.3.2.11 Cawan petri**, dengan ukuran 90 mm sampai 100 mm.
- 5.3.2.12 Glass beads** (Diameter: ≤ 5 mm).
- 5.3.2.13 Labu ukur**
- 5.3.2.14 Pengocok mekanis**
- 5.3.2.15 Refrigerator** dapat diatur pada suhu 2°C hingga 8°C .
- 5.3.2.16 Forceps**
- 5.3.2.17 Kabinet laminar air flow yang disaring secara mikrobiologis**
- 5.3.2.18 Fritted filter**: Porositas 40 μm hingga 100 μm (lihat ISO 4793).
- 5.3.2.19 Peralatan filtrasi membran**, dibuat dari bahan yang kompatibel dengan bahan yang akan disaring.

Peralatan harus memiliki penahan filter dengan volume minimum 50 ml. Peralatan ini harus sesuai untuk digunakan dengan filter berdiameter 47 mm sampai 50 mm dan ukuran pori 0,45 μm untuk sterilisasi air sadah (5.2.2.7).

5.3.2.20 Desikator vakum, desikator dengan pengering aktif. Sumber vakum dapat berupa pompa atau suplai sentral dan harus mampu mencapai vakum 20 mmHg hingga 25 mmHg (508-635 torr; 677-847 mbar; 68000-85000 Pascal; tabel konversi sudah tersedia di Internet untuk satuan lain).

⁹⁾ Vortex® adalah contoh produk yang tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan penggunastandar ini dan bukan merupakan dukungan CEN terhadap produk ini.

5.3.2.4 Incubator, (for bactericidal activity), capable of being controlled at either $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ or $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. An incubator at $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ may be used if an incubator at $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ is not available.

5.3.2.5 Incubator (for fungicidal or yeasticidal activity), capable of being controlled at $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.3.2.6 pH-meter, having an accuracy of calibration of 0,1 pH units at $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.3.2.7 Stopwatch

5.3.2.8 Vortex mixer (mechanical shaker or electromechanical agitator, i.e. Vortex® mixer¹⁰⁾).

5.3.2.9 Containers: Test tubes, culture bottles or flasks of suitable capacity.

5.3.2.10 Graduated pipettes, of nominal capacities 10 ml, 1 ml, 0,1 ml and 0,05 ml, or calibrated automatic pipettes.

5.3.2.11 Petri dishes, of size 90 mm to 100 mm.

5.3.2.13 Glass beads (Diameter: $\leq 5\text{ mm}$).

5.3.2.13 Volumetric flasks

5.3.2.14 Mechanical shaker

5.3.2.15 Refrigerator capable of being controlled at 2 °C to 8 °C

5.3.2.16 Forceps

5.3.2.17 Microbiological filtered laminar air flow cabinet

5.3.2.18 Fritted filter: Porosity of $40\text{ }\mu\text{m}$ to $100\text{ }\mu\text{m}$ (see ISO 4793)

5.3.2.19 Membrane filtration apparatus, constructed of a material compatible with the substances to be filtered

The apparatus shall have a filter holder of at least 50 ml volume. It shall be suitable for use with filters of diameter 47 mm to 50 mm and $0,45\text{ }\mu\text{m}$ pore size for sterilization of hard water (5.2.2.7).

5.3.2.20 Vacuum desiccator, *Desiccator* with an active desiccant. Vacuum source may be a pump or central supply and should achieve a vacuum of 20 mmHg to 25 mmHg (508-635 torr; 677-847 mbar; 68000-85000 Pascal; conversion tables are readily available on the Internet for other units).

⁵⁾ Vortex® in an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this standard and does not constitute an endorsement by CEN of this product.

5.4 Penyiapan suspensi organisme uji dan larutan uji produk

5.4.1 Suspensi organisme uji

5.4.1.1 Stok kultur organisme uji

Stok kultur harus disimpan sesuai dengan persyaratan EN 12353.

5.4.1.2 Kultur kerja (*working culture*) organisme uji

a) Bakteri:

Untuk menyiapkan kultur kerja organisme uji, siapkan subkultur dari stok kultur (lihat 5.4.1.1) dengan cara menggoreskan pada permukaan TSA (lihat 5.2.2.3) dan diinkubasi (lihat 5.3.2.4). Setelah 18 hingga 24 jam, siapkan subkultur kedua dari subkultur pertama dengan cara yang sama dan diinkubasi selama 18 hingga 24 jam. Dari subkultur kedua ini, subkultur ketiga dapat dibuat dengan cara yang sama.

CATATAN 1 Subkultur kedua dan/atau ketiga adalah kultur kerja.

Jika tidak memungkinkan untuk menyiapkan subkultur kedua pada hari tertentu, subkultur yang sudah 48 jam dapat digunakan untuk subkultur berikutnya, dengan syarat subkultur tersebut telah disimpan dalam inkubator selama periode 48 jam. Dalam keadaan ini, persiapkan lagi subkultur 24 jam setelah melanjutkan. Jangan mengambil subkultur keempat.

Untuk *strain* tambahan (lihat 5.2.1), setiap penyimpangan dari metode kultur bakteri atau pembuatan suspensi harus dicatat, dengan memberikan alasan pada laporan pengujian.

b) fungi:

Untuk mempersiapkan kultur kerja *Candida albicans*, lakukan subkultur dari kultur stok (lihat 5.4.1.1) dengan menggoreskan pada permukaan MEA (lihat 5.2.2.4) dan diinkubasi (lihat 5.3.2.5). Setelah 42 hingga 48 jam, siapkan subkultur kedua dari subkultur pertama dengan cara yang sama dan inkubasi selama 42 hingga 48 jam. Dari subkultur kedua ini, subkultur ketiga dapat diproduksi dengan cara yang sama.

CATATAN 1 Subkultur kedua dan/atau ketiga adalah kultur kerja.

Untuk *Aspergillus brasiliensis* (sebelumnya *A. niger*) (5.2.1), gunakan hanya subkultur pertama yang ditanam pada MEA (5.2.2.4) dalam cawan Petri atau labu dengan tutup berventilasi (5.3.2.17) dan diinkubasi pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 7 sampai 9 hari. Tidak diperlukan subkultur lebih lanjut. Jangan menumpuk cawan petri selama inkubasi untuk memperbaiki homogenisasi suhu.

Pada akhir inkubasi, semua kultur akan menunjukkan permukaan berwarna coklat tua atau hitam. Kultur dengan tampilan langka dan area putih atau abu-abu yang kecil mungkin dipertahankan.

5.4 Preparation of test organism suspensions and product test solutions

5.4.1 Test organism suspensions

5.4.1.1 Stock cultures of test organisms

Stocks cultures shall be kept in accordance with the requirements of EN 12353.

5.4.1.2 Preservation and stock cultures of test organisms

a) Bacteria:

In order to prepare the working culture of the test organism, subculture from the stock culture (see 5.4.1.1) by streaking on TSA slopes (see 5.2.2.3) and incubate (see 5.3.2.4). After 18 h to 24 h, prepare a second subculture from the first subculture in the same way and incubate for 18 h to 24 h. From this second subculture, a third subculture may be produced in the same way.

NOTE 1 The second and/or third subculture are the working culture(s).

If it is not possible to prepare the second subculture on a particular day, a 48 h subculture may be used for subsequent subculturing, provided that the subculture has been kept in the incubator during the 48 h period. In these circumstances, prepare a further 24 h subculture after proceeding. Do not take a fourth subculture.

For additional strains (see 5.2.1), any departure from this method of culturing the bacteria or preparing the suspensions shall be noted, giving the reasons in the test report.

b) fungi:

In order to prepare the working culture of *Candida albicans*, subculture from the stock culture (see 5.4.1.1) by streaking onto MEA slopes (see 5.2.2.4) and incubate (see 5.3.2.5). After 42 h to 48 h, prepare a second subculture from the first subculture in the same way and incubate for 42 h to 48 h. From this second subculture, a third subculture may be produced in the same way.

NOTE 2 The second and/or third subculture are the working culture(s).

For *Aspergillus brasiliensis* (previously *A. niger*) (5.2.1), use only the first subculture grown on MEA (5.2.2.4) in Petri dishes or flasks with ventilated caps (5.3.2.17) and incubate at 30 °C ± 1 °C for 7 d to 9 d. No further subculturing is needed. Do not stack the Petri dishes during the incubation to improve the temperature homogenization.

At the end of incubation, all the cultures shall show a dark brown or black surface. Cultures with appearance of rare and small white or grey areas might be kept.

5.4.1.3 Suspensi uji

a) Suspensi uji bakteri:

Ambil 10 ml pengencer (lihat 5.2.2.5) dan masukkan ke dalam labu 100 ml berisi 5 g *glass beads* (lihat 5.3.2.12). Ambil kultur kerja (lihat 5.4.1.2) dan masukkan satu ose penuh sel ke dalam pengencer. Sel harus tersuspensi dalam pengencer dengan cara merendam ose dalam pengencer dan menggoreskannya pada sisi labu untuk mengeluarkan sel. Kocok labu selama 3 menit dengan menggunakan pengocok mekanis (lihat 5.3.2.14). Aspirasi suspensi dari *glassbeads* dan pindahkan ke labu lain. Sesuaikan jumlah sel dalam suspensi menjadi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml hingga $5,0 \times 10^8$ cfu/ml menggunakan pengencer untuk *E. coli*, *E. hirae* dan *S. aureus*. Untuk *Pseudomonas aeruginosa*, sesuaikan jumlah sel dalam suspensi menjadi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml hingga $5,0 \times 10^8$ cfu/ml menggunakan pengencer untuk pengujian pada kondisi kotor dan sesuaikan ke $1,5 \times 10^9$ cfu/ml hingga $5,0 \times 10^9$ cfu/ml menggunakan pengencer untuk pengujian pada kondisi bersih.

Jumlah unit harus diperkirakan menggunakan spektrofotometer atau cara lain yang sesuai. Pertahankan suspensi ini dalam penangas air pada $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ dan gunakan dalam waktu 2 jam.

b) suspensi uji fungi:

1) *Candida albicans*:

Ambil 10 ml pengencer (lihat 5.2.2.5) dan masukkan ke dalam labu 100 ml berisi 5 g *glassbeads*. Ambil kultur kerja (lihat 5.4.1.2) dan masukkan satu ose penuh sel ke dalam pengencer. Sel harus tersuspensi dalam pengencer dengan merendam ose dalam pengencer dan menggoreskannya pada sisi labu untuk mengeluarkan sel. Kocok labu selama 3 menit menggunakan pengocok mekanis (5.3.2.14). Aspirasi suspensi dari *glassbeads* dan pindahkan ke labu lain. Sesuaikan jumlah sel dalam suspensi menjadi $1,5 \times 10^7$ cfu/ml hingga $5,0 \times 10^7$ cfu/ml menggunakan pengencer untuk pengujian yang akan dilakukan pada kondisi kotor, perkirakan jumlah unit dengan menggunakan spektrofotometer atau teknik lain yang cocok. Pertahankan suspensi ini dalam penangas air pada $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ dan gunakan dalam waktu 2 jam. Sesuaikan jumlah sel dalam suspensi menjadi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml hingga $5,0 \times 10^8$ cfu/ml menggunakan pengencer untuk pengujian yang akan dilakukan pada kondisi bersih, perkirakan jumlah unit dengan menggunakan spektrofotometer atau teknik lain yang cocok. Pertahankan suspensi ini dalam penangas air pada suhu $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ dan gunakan dalam 2 jam.

2) *Aspergillus brasiliensis* (ex *A. niger*):

Ambil kultur kerja (lihat 5.4.1.2) dan suspensikan sel dalam 10 ml larutan steril 0,05% b/v polisorbate 80⁶⁾ dalam air (lihat 5.2.2.2). Lepaskan konidiospora menggunakan batang pengaduk atau spatula steril dari permukaan kultur. Pindahkan suspensi ke dalam labu dan kocok perlahan dengan tangan selama satu menit bersama dengan *glassbeads* (lihat 5.3.2.12). Saring suspensi melalui *fritted filter* (lihat 5.3.2.18).

⁶⁾ Kualitas analitis, tidak terhidrolisis sesuai dengan Farmakope Eropa, Volume 1. TWEEN 80® adalah contoh produk cocok yang tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan demi kenyamanan pengguna standar ini dan bukan merupakan dukungan CEN terhadap produk ini.

5.4.1.3 Test suspensions

a) Bacterial test suspension:

Take 10 ml of diluent (see 5.2.2.5) and place in a 100 ml flask with 5 g of glass beads (see 5.3.2.12). Take the working culture (see 5.4.1.2) and transfer loopfuls of the cells into the diluent. The cells should be suspended in the diluent by immersing the loop in the diluent and rubbing it against the side of the flask to dislodge the cells. Shake the flask for 3 min using a mechanical shaker (see 5.3.2.14). Aspirate the suspension from the glass beads and transfer to another flask. Adjust the number of cells in the suspension to $1,5 \times 10^8$ cfu/ml to $5,0 \times 10^8$ cfu/ml using the diluent for *E. coli*, *E. hirae* and *S. aureus*. For *Pseudomonas aeruginosa* adjust the number of cells in the suspension to $1,5 \times 10^8$ cfu/ml to $5,0 \times 10^8$ cfu/ml using the diluent for tests under dirty conditions and adjust to $1,5 \times 10^9$ cfu/ml to $5,0 \times 10^9$ cfu/ml using the diluent for tests under clean conditions.

The numbers of units shall be estimated by means of spectrophotometer or any other suitable means. Maintain this suspension in the water bath at $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ and use within 2 h.

b) fungal test suspension:

1) *Candida albicans*:

Take 10 ml of diluent (see 5.2.2.5) and place in a 100 ml flask with 5 g of glass beads. Take the working culture (see 5.4.1.2) and transfer loopfuls of the cells into the diluent. The cells should be suspended in the diluent by immersing the loop in the diluent and rubbing it against the side of the flask to dislodge the cells. Shake the flask for 3 min using a mechanical shaker (5.3.2.14). Aspirate the suspension from the glass beads and transfer to another flask. Adjust the number of cells in the suspension to $1,5 \times 10^7$ cfu/ml to $5,0 \times 10^7$ cfu/ml using the diluent for tests to be performed under dirty conditions, estimating the numbers of units by means of a spectrophotometer or other suitable technique. Maintain this suspension in the water bath at $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ and use within 2 h. Adjust the number of cells in the suspension to $1,5 \times 10^8$ cfu/ml to $5,0 \times 10^8$ cfu/ml using the diluent for tests to be performed under clean conditions, estimating the numbers of units by means of a spectrophotometer or other suitable technique. Maintain this suspension in the water bath at $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ and use within 2 h.

2) *Aspergillus brasiliensis* (ex *A. niger*):

Take the working culture (see 5.4.1.2) and suspend the cells in 10 ml of sterile 0,05 % w/v polysorbate 80⁶⁾ solution in water (see 5.2.2.2). Using a sterile glass rod or spatula detach the conidiospores from the culture surface. Transfer the suspension into a flask and gently shake by hand for one minute together with glass beads (see 5.3.2.12). The suspension is filtered through a fritted filter (see 5.3.2.18).

Carry out a microscopic examination under x 400 magnification immediately after the preparation to show:

- the presence of a high concentration (at least 75 % of spiny spores) of characteristic mature spores, i.e. spiny spores (versus smooth spores);

⁶⁾ Analytical quality, non hydrolysed in accordance with European Pharmacopoeia, Volume 1. TWEEN 80® is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this standard and does not constitute an endorsement by CEN of this product.

Lakukan pengujian dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 x segera setelah preparasi untuk melihat:

- adanya konsentrasi tinggi (setidaknya 75% spora berduri) dari karakteristik spora dewasa seperti spora berduri (dibandingkan dengan spora halus);
- tidak adanya spora germinasi (periksa setidaknya pada 10 bidang pengamatan);
- tidak adanya fragmen *mycelia* (periksa minimum 10 bidang pandang).

Jika ada spora germinasi, buang suspensi.

Jika *mycelia* ada, lanjutkan ke filtrasi *fritted* kedua.

Jika *mycelia* masih ada, buang suspensi.

Jika spora berduri tidak mencapai 75%, hal itu mungkin disebabkan oleh kultur *Aspergillus brasiliensis* (*ex A. niger*) atau media yang digunakan untuk menghasilkan spora tersebut. Pada situasi ini, mungkin perlu untuk memperoleh kultur dari koleksi kultur lainnya dan/atau menggunakan MEA dari pemasok yang berbeda.

Sesuaikan jumlah spora dalam suspensi menjadi $1,5 \times 10^7$ cfu/ml hingga $5,0 \times 10^7$ cfu/ml dengan menggunakan pengencer (5.2.2.5), perkirakan jumlah cfu dengan cara yang sesuai. Gunakan suspensi dalam waktu 4 jam dalam penangas air yang diatur pada suhu $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Pada situasi apapun, sesuaikan suhu sesuai 5.5.1 segera sebelum pengujian dimulai (5.5.2).

Penggunaan alat penghitung sel untuk mengatur jumlah sel sangat dianjurkan. Saat menggunakan ruang hitung yang sesuai, ikuti instruksi dengan jelas.

Untuk menghitung, siapkan pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} dari suspensi uji menggunakan pengencer (5.2.2.5). Campur (5.3.2.8).

Ambil 1,0 ml sampel dari masing-masing pengenceran secara duplo dan inokulasikan menggunakan teknik cawan tuang atau cawan sebar.

- a) Bila menggunakan teknik cawan tuang, pindahkan sekitar setengah dari masing-masing 1,0 ml sampel ke dalam cawan Petri terpisah (misalnya untuk *duplo* = empat cawan) dan tambahkan 15 ml hingga 20 ml MEA cair (5.2.2.4), dinginkan hingga $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$.
- b) Bila menggunakan teknik cawan sebar, sebar sekitar seperempat dari setiap 1,0 ml sampel pada cawan permukaan-kering mengandung MEA (5.2.2.4) dengan jumlah yang sesuai (minimum empat), (misalnya untuk *duplo* - setidaknya delapan cawan).

Suspensi uji ini tidak boleh disimpan lebih dari 2 hari pada suhu 2°C hingga 8°C .

Suspensi uji harus dicampur (lihat 5.3.2.8) segera sebelum digunakan untuk mensuspensikan- ulang spora.

Carry out a microscopic examination under x 400 magnification immediately after the preparation to show:

- the presence of a high concentration (at least 75 % of spiny spores) of characteristic mature spores, i.e. spiny spores (versus smooth spores);
- the absence of spore germination (check at least 10 fields of view);
- the absence of mycelia fragments (check at least 10 fields of view).

If germinated spores are present, discard the suspension.

If mycelia are present, proceed to a 2nd fritted filtration.

If mycelia are still present, discard the suspension.

If 75 % spiny spores are not achieved it may be due to the *Aspergillus brasiliensis* (ex *A. niger*) culture or the media used to produce these spores. In this situation, it will be necessary to obtain the culture from another culture collection and/or use a MEA from a different supplier.

Adjust the number of spores in the suspension to $1,5 \times 10^7$ cfu/ml to $5,0 \times 10^7$ cfu/ml using the diluent (5.2.2.5), estimating the number of cfu by any suitable means. Use the suspension within 4 h in a water bath controlled at $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). In any case, adjust the temperature according to 5.5.1 only immediately before the start of the test (5.5.2).

The use of a cell counting device for adjusting the number of cells is highly recommended. When using a suitable counting chamber, follow the instructions explicitly.

For counting, prepare 10^{-5} and 10^{-6} dilutions of the test suspension using diluent (5.2.2.5). Mix (5.3.2.8).

Take a sample of 1,0 ml of each dilution in duplicate and inoculate using the pour plate or the spread plate technique.

- c) When using the pour plate technique, transfer about half of each 1,0 ml sample into separate Petri dishes (i.e. in duplicate = four plates) and add 15 ml to 20 ml of melted MEA (5.2.2.4), cooled to $(45 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.
- d) When using the spread plate technique, spread about one quarter of each 1,0 ml sample on an appropriate number (at least four) of surface dried plates containing MEA (5.2.2.4) (i.e. in duplicate – at least eight plates)

This test suspension shall not be stored more than 2 d at $2 \text{ }^\circ\text{C}$ to $8 \text{ }^\circ\text{C}$.

The test suspension shall be mixed (see 5.3.2.8) immediately before use to re-suspend the spores.

5.4.1.4 Penghitungan suspensi uji bakteri dan fungi

Encerkan suspensi bakteri dan *yeast* yang telah disesuaikan (lihat 5.4.1.3) sebanyak 10^{-6} (pengenceran serial) dan 10^{-7} untuk:

- *S. aureus*, *E. coli*, *E. hirae*;
- untuk *P. aeruginosa* dalam kondisi kotor;
- *C. albicans* dalam kondisi bersih.

Encerkan suspensi bakteri yang telah disesuaikan (lihat 5.4.1.3) sebanyak 10^{-7} (pengenceran serial) dan 10^{-8} untuk:

- *P. aeruginosa* dalam kondisi bersih;

Encerkan suspensi *yeast* yang telah disesuaikan (lihat 5.4.1.3) sebanyak 10^{-5} (pengenceran serial) dan 10^{-6} untuk:

- *C. albicans* dalam kondisi kotor.

Encerkan suspensi spora fungi yang telah disesuaikan sebanyak 10^{-5} dan 10^{-6} (lihat 5.4.1.3) dengan menggunakan pengencer (lihat 5.2.2.5). Campur suspensi (lihat 5.3.2.8).

Ambil sampel 1,0 ml dari masing-masing pengenceran duplo dan inokulasi cawan tuang. Pipet masing-masing 1,0 ml sampel ke dalam cawan Petri terpisah (lihat 5.3.2.11) dan tambahkan 15 ml hingga 20 ml TSA cair (lihat 5.2.2.2) untuk bakteri dan 15 ml hingga 20 ml MEA cair (lihat 5.2.2.3) untuk fungi, dinginkan sampai $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Saat menggunakan teknik cawan sebar, sebarlah setiap 1,0 ml sampel - dibagi menjadi beberapa bagian dengan ukuran yang kira-kira sama - pada jumlah yang sesuai (setidaknya dua) cawan kering permukaan yang mengandung TSA atau MEA.

a) Penghitungan suspensi uji bakteri

- 1) Untuk *strain* bakteri, inkubasikan cawan pada $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ atau pada $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam sampai 24 jam. Buang cawan yang tidak dapat dihitung untuk alasan apa pun. Inkubasi cawan selama 18 jam hingga 24 jam. Jangan menghitung kembali cawan yang tidak lagi menunjukkan koloni yang dapat dihitung. Hitung kembali cawan yang tersisa.

b) Penghitungan suspensi uji fungi

- 1) Untuk *strain* fungi, inkubasikan cawan pada $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam sampai 24 jam (*Candida albicans*), selama 42 jam sampai 48 jam (*Aspergillus brasiliensis*). Buang cawan yang tidak dapat dihitung untuk alasan apa pun. Hitung cawan dan tentukan jumlah unit pembentuk koloni. Inkubasikan cawan selama 18 jam hingga 24 jam. Jangan menghitung kembali cawan yang tidak lagi menunjukkan koloni yang terpisah dengan baik. Hitung kembali cawan yang tersisa. Untuk *Aspergillus brasiliensis*, lanjutkan inkubasi selama 20 jam sampai 24 jam dan jika perlu 20 jam sampai 24 jam lagi, asalkan jumlah koloni yang dapat dihitung (koloni terpisah) meningkat.

Tentukan jumlah koloni tertinggi untuk setiap 1 ml sampel.

Untuk inkubasi dan penghitungan, lihat 5.4.1.5.

5.4.1.5 Counting of bacterial and fungal test suspensions

Dilute the adjusted bacterial and yeast suspensions (see 5.4.1.3) by 10^{-6} (serial dilutions) and 10^{-7} for:

- *S. aureus*, *E. coli*, *E. hirae*;
- for *P. aeruginosa* under dirty conditions;
- *C. albicans* under clean conditions.

Dilute the adjusted bacterial suspension (see 5.4.1.3) by 10^{-7} (serial dilutions) and 10^{-8} for:

- *P. aeruginosa* under clean conditions.

Dilute the adjusted yeast suspension (see 5.4.1.3) by 10^{-5} (serial dilutions) and 10^{-6} for:

- *C. albicans* under dirty conditions.

Dilute the adjusted mould spore suspension by 10^{-5} and 10^{-6} (see 5.4.1.3) using diluent (see 5.2.2.5). Mix the suspension (see 5.3.2.8).

Take a sample of 1,0 ml of each dilution in duplicate and inoculate pour plates. Pipette each 1,0 ml sample into separate Petri dishes (see 5.3.2.11) and add 15 ml to 20 ml melted TSA (see 5.2.2.2) for the bacteria and 15 ml to 20 ml melted MEA (see 5.2.2.3) for the fungi, cooled to $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. When using the spread plate technique, spread each 1,0 ml sample – divided into portions of approximately equal size – on an appropriate number (at least two) of surface dried plates containing TSA or MEA.

c) Counting of bacterial test suspensions

- 1) For the bacterial strains, incubate the plates at $(36 \pm 1)\text{ °C}$ or at $(37 \pm 1)\text{ °C}$ for 18 h to 24 h. Discard any plates which are not countable for any reason. Incubate the plates for a further 18 h to 24 h. Do not recount plates which no longer show countable colonies. Recount the remaining plates.

d) Counting of fungal test suspensions

- 1) For the fungal strains, incubate the plates at $(30 \pm 1)\text{ °C}$ for 18 h to 24 h (*Candida albicans*), for 42 h to 48 h (*Aspergillus brasiliensis*). Discard any plates which are not countable for any reason. Count the plates and determine the number of colony forming units. Incubate the plates for a further 18 h to 24 h. Do not recount plates which no longer show well-separated colonies. Recount the remaining plates. For *Aspergillus brasiliensis*, continue incubation for a further 20 h to 24 h and if necessary a further 20 h to 24 h, provided the number of countable colonies (discrete colonies) is increasing.

Determine the highest number of colonies for each 1 ml sample.

For incubation and counting, see 5.4.1.5.

5.4.1.5 Penghitungan rata-rata tertimbang dari suspensi uji

- a) Buang cawan yang tidak dapat dihitung dengan alasan apa pun. Hitung cawan dan tentukan jumlah cfu. Jangan menghitung kembali cawan yang tidak lagi menunjukkan koloni yang terpisah dengan baik. Hitung kembali cawan yang tersisa. Jika jumlahnya meningkat, gunakan hanya angka yang lebih tinggi untuk evaluasi lebih lanjut.
- b) Hanya cawan yang menunjukkan jumlah koloni dalam rentang 15-300 untuk bakteri dan yeast serta 15-150 untuk fungi yang digunakan dalam melakukan penghitungan hasil. Penyimpangan 10% dapat diterima, jadi batasnya adalah 14 dan 330 untuk bakteri dan yeast serta 14-165 untuk fungi.

$$N = \lg \frac{0,025 \times c}{(n_1 + 0,1 n_2) \times d} \quad (1)$$

dengan:

- c adalah jumlah dari nilai V_c yang diperhitungkan;
- n_1 adalah jumlah nilai V_c yang diperhitungkan dalam pengenceran yang lebih rendah, mis. 10^{-6} ;
- n_2 adalah jumlah nilai V_c yang diperhitungkan dalam pengenceran yang lebih tinggi, mis. 10^{-7} ;
- d adalah faktor pengenceran yang sesuai dengan pengenceran yang lebih rendah, mis. 10^{-6} .

5.4.2 Larutan produk uji

Rincian sampel produk yang diterima harus dicatat.

Larutan produk uji harus disiapkan dalam air sadah (lihat 5.2.2.7) dengan minimum tiga konsentrasi berbeda agar mencakup satu konsentrasi dalam rentang aktif dan satu konsentrasi dalam rentang non aktif.

Untuk produk padat, larutkan produk seperti saat diterima dengan menimbang minimum $1 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ produk dalam labu ukur dan encerkan dengan air sadah (lihat 5.2.2.7). Pengenceran selanjutnya harus disiapkan dalam labu takar (lihat 5.3.2.13) dalam bentuk volume/volume dalam air sadah (lihat 5.2.2.7).

Untuk produk cair, pengenceran produk harus disiapkan dalam air sadah (lihat 5.2.2.7) dalam bentuk volume/volume dengan menggunakan labu ukur (lihat 5.3.2.13).

Produk yang diterima dapat digunakan sebagai salah satu dari larutan produk uji. Untuk produk yang diterima dalam keadaan siap pakai, air (lihat 5.2.2.2) harus digunakan untuk membuat pengenceran.

Ketika produk diencerkan dalam air sadah, preparasi produk harus homogen secara fisik dan dan stabil.

Larutan produk uji dan pengencerannya harus disiapkan baru dan digunakan dalam waktu 2 jam.

Konsentrasi produk yang disebutkan dalam laporan pengujian haruslah konsentrasi uji. Catat konsentrasi uji dalam bentuk volume per volume atau berat per volume.

5.4.1.5 Counting the weighed mean of the test suspensions

- c) Discard any plates that are not countable for any reason. Count the plates and determine the total number of cfu. Do not recount plates that no longer show well-separated colonies. Recount the remaining plates. If the number has increased, use only the higher number for further evaluation.
- d) Only the plates showing a number of colonies included in a 15-300 for bacteria and yeast and 15- 150 for mould range were used to perform the result calculation. A deviation of 10 % is accepted, so the limits are 14 and 330 for bacteria and yeast and 14-165 for mould.

$$N = \text{Log } 0,025 \times c .$$

$$(n_1 + 0,1 n_2) \times d \tag{1}$$

where

c is the sum of the *V_c* values taken into account;

n₁ is the number of *V_c* values taken into account in the lower dilution, e.g. 10⁻⁶;

n₂ is the number of *V_c* values taken into account in the higher dilution, e.g. 10⁻⁷;

d is the dilution factor corresponding to the lower dilution e.g. 10⁻⁶ .

5.4.2 Product test solutions

Details of samples of the product as received shall be recorded.

Product test solutions shall be prepared in hard water (see 5.2.2.7) at minimum three different concentrations to include one concentration in the active range and one concentration in the non active range.

For solid products, dissolve the product as received by weighing at least 1 g ± 10 mg of the product in a volumetric flask and dilute with hard water (see 5.2.2.7) Subsequent dilutions shall be prepared in volumetric flasks (see 5.3.2.13) on a volume/volume basis in hard water (see 5.2.2.7).

For liquid products, dilutions of the product shall be prepared in hard water (see 5.2.2.7) on a volume/volume basis using volumetric flasks (see 5.3.2.13).

The product as received may be used as one of the product test solutions. For products supplied in a ready to use state, water (see 5.2.2.2) shall be used to prepare dilutions.

When the product is diluted in hard water, it shall give a physically homogeneous stable preparation.

The product test solution and dilutions of it shall be prepared freshly and used within 2 h.

The concentration of the product stated in the test report shall be the test concentration. Record the test concentration in terms of volume per volume or weight per volume.

5.5 Prosedur

5.5.1 Pemilihan kondisi percobaan

Pemilihan suhu kontak, waktu kontak dan zat pengganggu harus sesuai dengan penggunaan praktis yang dipertimbangkan untuk produk (lihat Pasal 4, Tabel 1) sebagai berikut:

- a) suhu uji; θ ($^{\circ}\text{C}$):
 - 1) suhu uji harus dipilih pada rentang $(4 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ hingga $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Ruang dengan pengatur suhu harus digunakan untuk suhu selain suhu ruang. Untuk pengujian yang dilakukan pada suhu kamar, kisaran suhu harus antara 18°C dan 25°C ;
- b) waktu kontak; t (mnt):
 - 1) waktu kontak harus dipilih pada rentang dari 1 menit hingga 5 menit (± 5 detik) dengan interval 1 menit dan antara 5 menit hingga 60 menit (± 10 detik) dengan interval 5 menit;
- c) *strain*:
 - 1) organisme uji harus seperti yang dicantumkan pada 5.2.1.
- d) jika ada zat pengganggu:
 - 1) zat pengganggu yang akan diuji adalah 0,3 g/l *bovine albumin* (5.2.2.8.2) untuk kondisi bersih (5.2.2.8.2) atau 3,0 g/l *bovine albumin* (5.2.2.8.2) untuk kondisi kotor menurut Pasal 4, Tabel 1 dan penerapan praktis;
 - 2) Untuk penerapan produk susu, susu skim harus digunakan (lihat 5.2.2.8.3).

Produk tidak boleh menyebabkan pembentukan endapan apapun yang dapat diamati dalam kondisi percobaan yang digunakan.

5.5.2 Prosedur uji

5.5.2.1 Uji "Nd" - penentuan konsentrasi mikrobisida

Prosedur untuk menentukan konsentrasi mikrobisida adalah sebagai berikut:

- a) Untuk menyiapkan suspensi mikrobial uji, pipet 1,0 ml zat pengganggu (5.2.2.8) ke dalam tabung. Tambahkan 1,0 ml suspensi uji (5.4.1.3). Segera mulai *stopwatch*, campur dan letakkan tabung di penangas air atau alat dengan pengatur suhu (5.3.2.2) pada suhu uji yang dipilih $\theta^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 2 menit ± 10 detik.

Segera sebelum penambahan, suspensi uji sebaiknya dicampur dengan baik agar organisme tersuspensi kembali sepenuhnya.

- b) Tempatkan permukaan uji (5.2.3) dalam cawan Petri steril dan pastikan cawan dalam posisi horizontal. Siapkan permukaan uji dengan menginokulasikan 0,05 ml suspensi uji mikroba (5.5.2.1.a) ke setiap permukaan uji (lihat Gambar 1). Keringkan permukaan pada suhu 37°C sampai terlihat kering (lihat Gambar 2). Dapat dipahami bahwa pengeringan permukaan uji dapat terjadi pada kecepatan yang berbeda karena kondisi lingkungan laboratorium dan desain inkubator (misalnya dengan atau tanpa kipas). Sebagai alternatif, tempatkan permukaan dalam cawan Petri terbuka untuk mengeringkan, sisi yang diinokulasi paling atas pada 18°C sampai 25°C dalam desikator vakum tidak lebih dari 60 menit.

5.5 Procedure

5.5.1 Choice of experimental conditions

The selection of contact temperature, contact time and interfering substances shall be carried out according to the practical use considered for the product (see Clause 4, Table 1) as follows:

- e) test temperature; θ ($^{\circ}\text{C}$):
 - 2) test temperatures shall be chosen in a range from (4 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ to (40 ± 1) $^{\circ}\text{C}$. A temperature controlled chamber should be used for temperatures other than ambient. For tests performed at room temperature, the range shall be between 18 $^{\circ}\text{C}$ and 25 $^{\circ}\text{C}$;
- f) contact time; t (min):
 - 2) contact times shall be chosen in a range from 1 min to 5 min (± 5 s) at intervals of 1 min and between 5 min to 60 min (± 10 s) at intervals of 5 min;
- g) strains:
 - 2) test organisms shall be as given in 5.2.1
- h) in case of interfering substances:
 - 1) the interfering substance to be tested is 0,3 g/l bovine albumin (5.2.2.8.2) for clean conditions (5.2.2.8.2) or 3,0 g/l bovine albumin (5.2.2.8.2) for dirty conditions according to Clause 4, Table 1 and practical applications ;
 - 2) For dairy applications skim milk should be used (see 5.2.2.8.3).

The product shall not cause the formation of any observable precipitate in the experimental conditions used.

5.5.2 Test procedure

5.5.2.1 Test “*N_d*” – determination of microbicidal concentrations

The procedure for determining microbicidal concentrations is as follows:

- b) To prepare the microbial test suspension pipette 1,0 ml of the interfering substance (5.2.2.8) into a tube. Add 1,0 ml of the test suspension (5.4.1.3). Start the stopwatch immediately, mix and place the tube in a water bath or temperature controlled cabinet (5.3.2.2) at the at the chosen test temperature θ $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$ for 2 min ± 10 s.

Immediately before addition, the test suspension should be well mixed to fully re-suspend the organisms.

- b) Place the test surfaces (5.2.3) in a sterile Petri dish and ensure that the dish is in a horizontal position. Prepare the test surfaces by inoculating 0,05 ml of the microbial test suspension (5.5.2.1.a) on to each test surface (see Figure 1). Dry the surfaces at 37 $^{\circ}\text{C}$ until they are visibly dry (see Figure 2). It is understood that drying of the test surfaces will occur at different rates due to the ambient conditions of the laboratory and the design of the incubator (e.g. with or without a fan). Alternatively, place surfaces in an open Petri dish to dry, inoculated side uppermost at 18 $^{\circ}\text{C}$ to 25 $^{\circ}\text{C}$ in a vacuum desiccator for not longer than 60 min.

Pastikan cawan petri terbuka sebagian dengan meletakkan tutupnya di tengah. Periksa apakah desikator ditutup dengan benar. Pasang *outlet* desikator ke sumber vakum dan mulai pengeluaran udara untuk mencapai vakum 20 mmHg hingga 25 mmHg (508-635 torr; 677-847 mbar; 68000-85000 Pascal; tabel konversi sudah tersedia di Internet untuk unit lain).

Untuk alasan ini tidak ada durasi waktu yang diberikan dan setiap laboratorium perlu menetapkan waktu minimum yang diperlukan agar permukaan menjadi terlihat kering. Waktu pengeringan tidak boleh lebih dari 60 menit. Biarkan permukaan uji menyetimbangkan dengan suhu uji yang dipilih ($\theta \pm 1$)°C.



Gambar 1 — Pembawa terinokulasi (*Inoculated carrier*)



Gambar 2 — Tampilan inokulum kering

Ensure that the Petri dish is partially open by placing its lid off centre. Check that desiccator is properly sealed. Attach the outlet of the desiccator to a vacuum source and start evacuation of the air to achieve a vacuum of 20 mmHg to 25 mmHg (508-635 torr; 677-847 mbar; 68000-85000 Pascal; conversion tables are readily available on the Internet for other units).

For this reason no time duration is given and the minimum required time for the surfaces to become visibly dry should be established for each laboratory. The drying time should not exceed 60 min. Allow the test surfaces to equilibrate with the chosen test temperature ($\theta \pm 1$) °C.

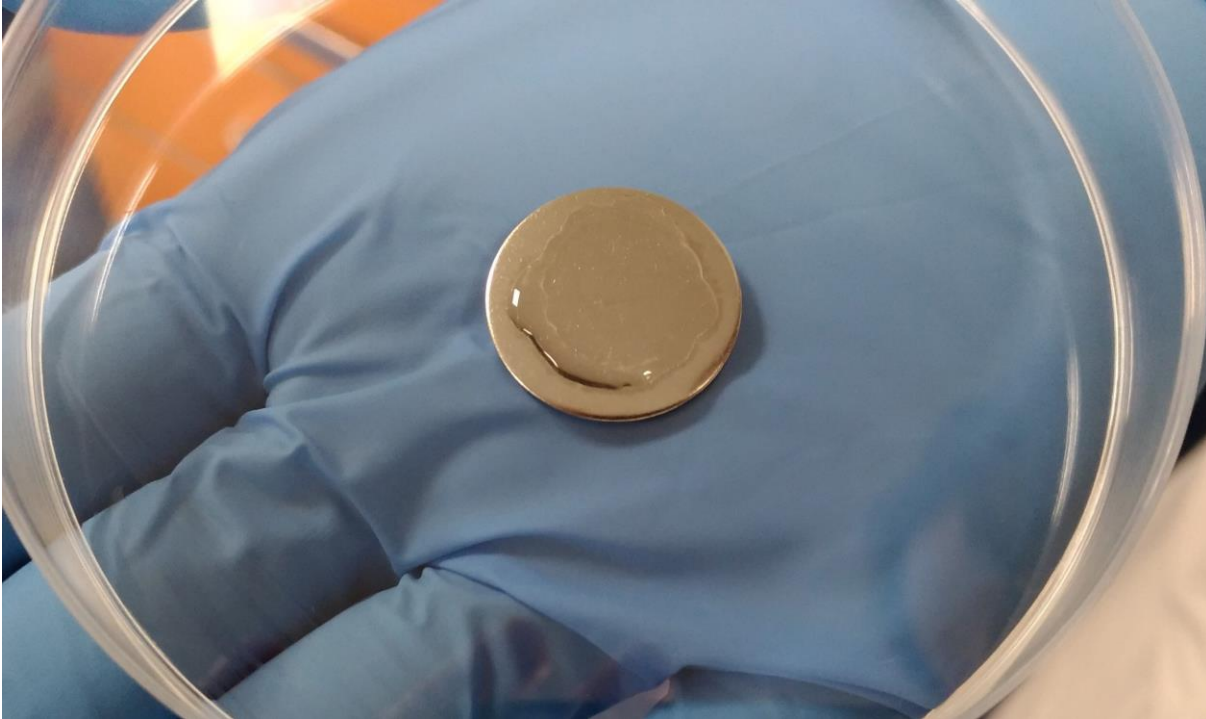


Figure 1 — Inoculated carrier



Figure 2 — Visibly dry inoculum

- c) Pipet 0,1 ml dari setiap Larutan produk uji (5.4.2) untuk diuji pada permukaan kering terpisah, pastikan bahwa inokulum kering benar-benar tertutup oleh produk uji. Tempatkan permukaan dalam kabinet dengan pengatur suhu (5.3.2.2) pada suhu uji yang dipilih $\theta^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan waktu kontak t (lihat Gambar 3).



Gambar 3 — Produk diaplikasikan di atas pembawa terinokulasi

- d) Di akhir t , pindahkan setiap permukaan (N_d) ke wadah terpisah yang berisi 10 ml penetral (5.2.2.6) bersama dengan *glassbeads* secukupnya (misalnya 5 g) untuk menopang permukaan. Permukaan sebaiknya ditempatkan dengan permukaan terinokulasi ke bawah yang bersentuhan dengan *beads*. Kocok wadah minimum 1 menit. Pengocokan harus cukup kuat untuk memastikan bahwa permukaan uji bergerak secara konstan di atas *beads*. Setelah waktu netralisasi 5 menit \pm 10 detik siapkan pengenceran bertingkat 10 kali lipat dari 10^{-1} hingga 10^{-2} dari campuran yang dinetralkan dalam pengencer (5.2.2.5). Ambil 1,0 ml sampel campuran yang dinetralkan dan masing-masing pengenceran duplo dan inokulasikan menggunakan teknik cawan tuang atau cawan sebar.
- 1) Bila menggunakan teknik cawan tuang, pipet masing-masing 1,0 ml sampel ke dalam cawan Petri terpisah dan tambahkan 15 ml hingga 20 ml TSA cair (5.2.2.3) untuk bakteri dan MEA (5.2.2.4) untuk fungi, dinginkan sampai $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - 2) Saat menggunakan teknik cawan sebar, sebarlah setiap sampel 1,0 ml - dibagi menjadi beberapa bagian dengan ukuran yang kira-kira sama - pada jumlah yang sesuai (minimum dua) cawan kering permukaan yang mengandung TSA (5.2.2.3)

Untuk inkubasi dan penghitungan, lihat 5.5.3

- e) Kondisikan kembali permukaan uji ("Nts"), biarkan penetral mengalir dan bilas dengan 10 ml air (5.2.2.2). Pindahkan ke cawan Petri berisi 10 ml TSA yang dipadatkan (5.2.2.3) untuk bakteri dan cawan Petri yang berisi 10 ml MEA yang dipadatkan (5.2.2.4) untuk fungi dan letakkan di atas agar, sisi uji paling atas. Tambahkan 10 ml TSA (5.2.2.3) dan/atau MEA (5.2.2.4) cair dan dinginkan hingga 45°C .

- c) Pipette 0,1 ml of each product test solution (5.4.2) to be tested on to separate dried surfaces ensuring that the dried inoculum is totally covered by the test product. Place the surfaces in a temperature controlled cabinet (5.3.2.2) at the chosen test temperature θ °C \pm 1°C and contact time t (see Figure 3).

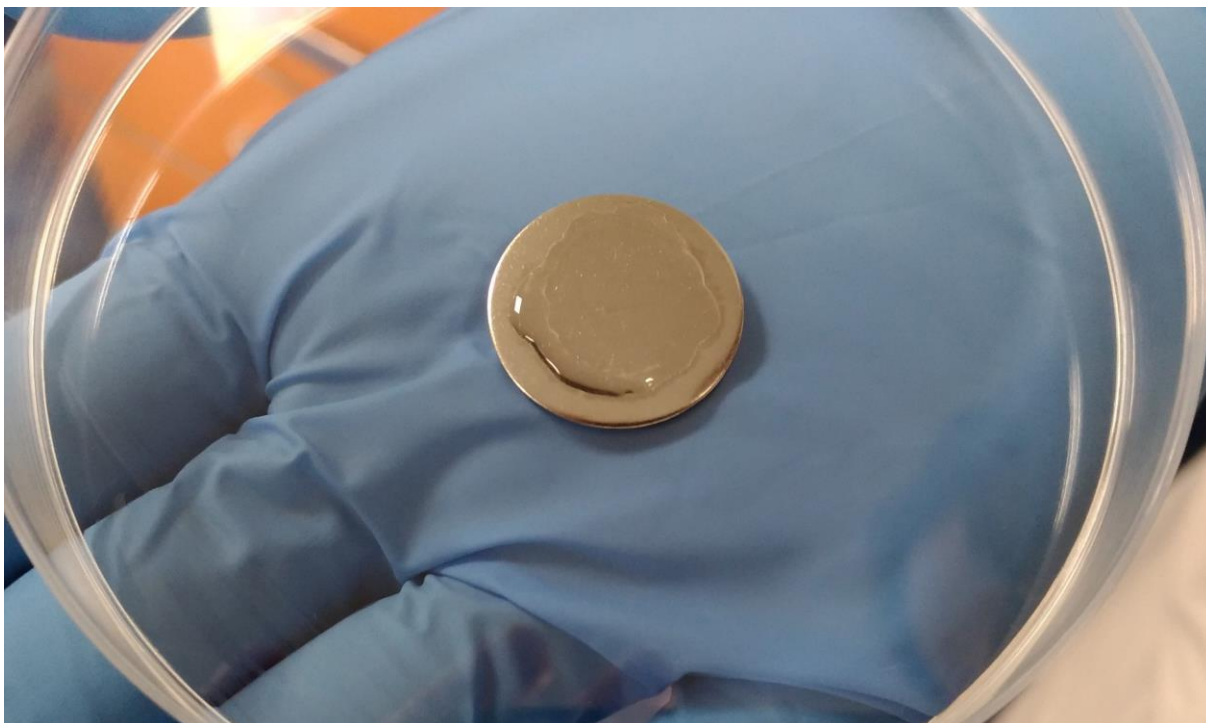


Figure 3 — Product applied onto inoculated carrier

- d) At the end of t , transfer each of the surfaces (N_d) to a separate container containing 10 ml of neutralizer (5.2.2.6) together with sufficient glass beads (for example 5 g) to support the surface. The surfaces should be placed with the inoculated surface downwards in contact with the beads. Shake the containers for minimum 1 min. The shaking should be sufficiently vigorous to ensure that the test surface moves constantly over the beads. After the neutralization time of 5 min \pm 10 s prepare a series of 10-fold dilutions from 10^{-1} to 10^{-2} of the neutralized mixture in the diluent (5.2.2.5). Take a 1,0 ml sample of the neutralized mixture and each of the dilutions in duplicate and inoculate using pour plate or spread plate technique.
- 1) When using the pour plate technique, pipette each 1,0 ml sample into separate Petri dishes and add 15 ml to 20 ml of melted TSA (5.2.2.3) for the bacteria and MEA (5.2.2.4) for the fungi, cooled to 45 °C \pm 1 °C.
 - 2) When using the spread plate technique, spread each 1,0ml sample – divided into portions of approximately equal size – on an appropriate number (at least two) of surface dried plates containing TSA (5.2.2.3)

For incubation and counting, see 5.5.3.

- e) Recover the test surface (N_t), let the neutralizer drain off and rinse with 10 ml of water (5.2.2.2). Transfer to a Petri dish containing 10 ml of solidified TSA (5.2.2.3) for bacteria and Petri dish containing 10 ml of solidified MEA (5.2.2.4) for fungi and place on top of the agar, test side uppermost. Add 10 ml of TSA (5.2.2.3) and/or MEA (5.2.2.4) melted and cooled to 45 °C.

- f) Lakukan prosedur a) hingga e) menggunakan Larutan produk uji lainnya pada waktu yang bersamaan.
- g) Lakukan prosedur a) sampai f) dengan menerapkan hal wajib lainnya dan jika sesuai kondisi percobaan tambahan lainnya (5.5.1).

5.5.2.2 Kontrol air "Nc"

Prosedur cara penentuan kontrol air adalah sebagai berikut:

- a) Tempatkan satu permukaan uji (5.2.3) dalam cawan Petri steril dan pastikan cawan dalam posisi horizontal. Inokulasikan 0,05 ml suspensi uji mikroba [5.5.2.1 a)] ke permukaan uji. Keringkan permukaan pada suhu 37°C sampai terlihat kering [5.5.2.1 b)].
- b) Untuk kontrol air (Nc), pipet 0,1 ml air sadah (5.2.2.7) atau air (5.2.2.2) untuk produk siap pakai pada permukaan uji, pastikan bahwa inokulum kering benar-benar tertutup air. Tempatkan permukaan dalam kabinet pengatur suhu (5.3.2.2) pada suhu uji yang dipilih $\theta \pm 1^\circ\text{C}$.
- c) Pada akhir t, pindahkan permukaan "Nc" ke dalam wadah yang berisi 10 ml penetral (5.2.2.6) bersama dengan *glassbeads* yang cukup (misalnya 5 g) untuk menopang permukaan. Permukaan harus ditempatkan dengan permukaan terinokulasi ke bawah yang bersentuhan dengan *beads*. Kocok wadah minimum 1 menit. Pengocokan harus cukup kuat untuk memastikan bahwa permukaan uji bergerak secara konstan di atas *beads*. Setelah waktu netralisasi 5 menit ± 10 detik siapkan rangkaian pengenceran 10 kali lipat. Untuk *strain* bakteri, siapkan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (dan 10^{-7} untuk *Pseudomonas aeruginosa* yang diuji dalam kondisi bersih) dan untuk *strain* fungi 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (dan 10^{-6} untuk *Candida albicans* diuji dalam kondisi bersih). Ambil sampel 1,0 ml dari pengenceran dalam duplo dan inokulasikan menggunakan teknik *cawan tuang* atau cawan sebar.
- d) Kondisikan kembali permukaan uji ("Nts"), biarkan penetral mengalir dan bilas dengan 10 ml air (5.2.2.2). Pindahkan ke cawan Petri berisi 10 ml TSA yang dipadatkan (5.2.2.3) untuk bakteri dan cawan Petri yang berisi 10 ml MEA yang dipadatkan (5.2.2.4) untuk fungi dan letakkan di atas agar, sisi uji paling atas. Tambahkan 10 ml TSA (5.2.2.3) dan/atau MEA (5.2.2.4) cair dan dinginkan hingga 45°C. Untuk inkubasi dan penghitungan, lihat 5.5.3.

5.5.2.3 Kontrol penetral "NC" - verifikasi tidak adanya toksisitas penetral

Untuk memverifikasi tidak adanya toksisitas penetral, prosedurnya adalah sebagai berikut:

- a) Siapkan satu permukaan uji yang diinokulasi [5.5.2.1 a) dan b)].
- b) Pipet penetral 10 ml (5.2.2.6) ke dalam wadah dengan *glassbeads* secukupnya (misalnya 5 g) untuk menopang permukaan. Kemudian tambahkan 0,1 ml air sadah (5.2.2.7) atau air (5.2.2.2) untuk produk yang siap pakai. Campur dan biarkan kontak selama 5 menit ± 10 detik pada $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- c) Pada akhir waktu netralisasi, pindahkan permukaan uji terinokulasi dan kering ke dalam wadah dan tempatkan permukaan terinokulasi ke bawah yang bersentuhan dengan *beads* (misalnya 5 g). Kocok wadah minimum 1 menit. Pengocokan harus cukup kuat untuk memastikan bahwa permukaan uji bergerak secara konstan di atas *beads*.

- f) Perform the procedure a) to e) using the other product test solutions at the same time.
- g) Perform the procedure a) to f) applying the other obligatory and if appropriate other additional experimental conditions (5.5.1).

5.5.2.2 Water control “Nc”

The procedure for determining the water control is as follows :

- a) Place one test surface (5.2.3) in a sterile Petri dish and ensure that the dish is in a horizontal position. Inoculate 0,05 ml of the microbial test suspension [5.5.2.1 a)] on to the test surface. Dry the surface at 37 °C until it is visibly dry [5.5.2.1 b)].
- b) For the water control (Nc), pipette 0,1 ml of hard water (5.2.2.7) or water (5.2.2.2) in the case of ready-to use products on to the test surface ensuring that the dried inoculum is totally covered by the water. Place the surface in a temperature controlled cabinet (5.3.2.2) at the chosen test temperature $\theta \pm 1$.°C.
- c) At the end of t , transfer the surface “Nc” into a container containing 10 ml of neutralizer (5.2.2.6) together with sufficient glass beads (for example 5 g) to support the surface. The surfaces should be placed with the inoculated surface downwards in contact with the beads. Shake the containers for minimum 1 min. The shaking should be sufficiently vigorous to ensure that the test surface moves constantly over the beads. After a neutralization time of 5 min \pm 10 s prepare a series of 10-fold dilutions. For the bacterial strains prepare 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (and 10^{-7} for *Pseudomonas aeruginosa* tested under clean conditions) dilutions and for the fungal strains 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (and 10^{-6} for *Candida albicans* tested under clean conditions). Take a 1,0 ml sample of these dilutions in duplicate and inoculate using the pour plate or the spread plate technique.
- d) Recover the test surface (“Nts”), let the neutralizer drain off and rinse with 10 ml of water (5.2.2.2). Transfer to a Petri dish containing 10 ml of solidified TSA (5.2.2.3) for bacteria and Petri dish containing 10 ml of solidified MEA (5.2.2.4) for fungi and place on top of the agar, test side uppermost. Add 10 ml of TSA (5.2.2.3) and/or MEA (5.2.2.4) melted and cooled to 45 °C. For incubation and counting, see 5.5.3.

5.5.2.3 Neutralizer control “NC” - verification of the absence of toxicity of the neutralizer

To verify the absence of toxicity of the neutralizer, the procedure is as follows:

- a) Prepare one inoculated test surface [5.5.2.1 a) and b)].
- b) Pipette 10 ml of neutralizer (5.2.2.6) into a container with sufficient glass beads (for example 5 g) to support the surface. Then add 0,1 ml of hard water (5.2.2.7) or water (5.2.2.2) in the case of ready-to-use products. Mix and leave in contact for 5 min \pm 10 s at 20 °C \pm 1 °C.
- c) At the end of the neutralization time transfer the inoculated and dried test surface into the container and place the inoculated surface own wards in contact with the beads (for example 5 g). Shake the containers for minimum 1 min. The shaking should be sufficiently vigorous to ensure that the test surface moves constantly over the beads.

- d) Untuk *strain* bakteri, persiapkan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (dan 10^{-7} untuk *Pseudomonas aeruginosa* yang diuji dalam kondisi bersih) dan untuk *strain* fungi 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (dan 10^{-6} untuk *Candida albicans* diuji dalam kondisi bersih). Ambil sampel 1,0 ml dari masing-masing pengenceran dalam duplo dan inokulasikan menggunakan teknik cawan tuang atau cawan sebar [5.5.2.2 d)]. Untuk inkubasi dan penghitungan, lihat 5.5.3

5.5.2.4 Validasi metode “NT” – pengenceran – validasi netralisasi

Untuk memvalidasi metode netralisasi pengenceran, prosedurnya adalah sebagai berikut:

- a) Siapkan satu permukaan uji [5.5.2.1 a) dan b)].
- b) Pipet penetral 10 ml (5.2.2.7) ke dalam wadah dengan *glassbeads* yang cukup untuk menopang permukaan. Kemudian tambahkan 0,1 ml konsentrasi produk tertinggi yang digunakan dalam pengujian (5.5.2.2). Campur dan biarkan kontak selama 5 menit \pm 10 detik pada $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- c) Pada akhir waktu netralisasi pindahkan permukaan uji yang diinokulasi ke dalam wadah dan tempatkan permukaan yang diinokulasi ke bawah agar kontak dengan *beads* (misalnya 5 g). Kocok wadah minimum 1 menit. Pengocokan harus cukup kuat untuk memastikan bahwa permukaan uji bergerak secara konstan di atas *beads*.
- d) Untuk *strain* bakteri, persiapkan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (dan 10^{-7} untuk *Pseudomonas aeruginosa* yang diuji dalam kondisi bersih) dan untuk *strain* fungi 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (dan 10^{-6} untuk *Candida albicans* diuji dalam kondisi bersih). Ambil sampel 1,0 ml masing-masing pengenceran duplo dan inokulasikan menggunakan teknik cawan tuang atau cawan sebar.

5.5.3 Penghitungan campuran uji

Untuk *strain* bakteri, inkubasi cawan pada $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ atau pada $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

Untuk *strain* fungi, inkubasi cawan pada $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam sampai 24 jam (*Candida albicans*), selama 42 jam sampai 48 jam (*Aspergillus brasiliensis*). Buang cawan yang tidak dapat dihitung dengan alasan apa pun. Hitung cawan dan tentukan jumlah unit pembentuk koloni. Inkubasi pelat selama 18 jam hingga 24 jam. Jangan menghitung kembali cawan yang tidak lagi menunjukkan koloni yang terpisah dengan baik. Hitung kembali cawan yang tersisa. Untuk *Aspergillus brasiliensis*, lanjutkan inkubasi selama 18 jam sampai 24 jam dan jika perlu 18 jam sampai 24 jam lagi, asalkan jumlah koloni yang dapat dihitung (koloni terpisah) meningkat.

Catat jumlah unit pembentuk koloni (Nts) yang tersisa di permukaan uji.

Buang cawan yang tidak dapat dihitung dengan alasan apa pun. Hitung cawan dan tentukan jumlah cfu. Jangan menghitung kembali cawan yang tidak lagi menunjukkan koloni yang terpisah dengan baik. Hitung kembali cawan yang tersisa. Jika jumlahnya meningkat, gunakan hanya angka yang lebih tinggi untuk evaluasi lebih lanjut.

Hanya cawan yang menunjukkan jumlah koloni dalam rentang 15-300 untuk bakteri dan ragi dan 15-150 untuk fungi yang digunakan untuk penghitungan hasil. Deviasi 10% dapat diterima, jadi batasnya adalah 14 dan 330 untuk bakteri dan ragi dan 14-165 untuk fungi.

- d) For the bacterial strains prepare 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (and 10^{-7} for *Pseudomonas aeruginosa* tested under clean conditions) dilutions and for the fungal strains 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (and 10^{-6} for *Candida albicans* tested under clean conditions). Take a sample of 1,0 ml of each of the dilutions in duplicate and inoculate using the pour plate or the spread plate technique [5.5.2.2 d)]. For incubation and counting, see 5.5.3

5.5.2.4 Method validation “NT” - dilution-neutralization validation

To validate the dilution neutralization method, the procedure is as follows:

- e) Prepare one test surface [5.5.2.1 a) and b)].
- f) Pipette 10 ml of neutralizer (5.2.2.7) into a container with sufficient glass beads to support the surface. Then add 0,1 ml of the highest product concentration used in the test (5.5.2.2). Mix and leave in contact for 5 min \pm 10 s at 20 °C \pm 1 °C.
- g) At the end of the neutralization time transfer the inoculated test surface into the container and place the inoculated surface downwards in contact with the beads (for example 5 g). Shake the containers for minimum 1 min. The shaking should be sufficiently vigorous to ensure that the test surface moves constantly over the beads.
- h) For the bacterial strains prepare 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (and 10^{-7} for *Pseudomonas aeruginosa* tested under clean conditions) dilutions and for the fungal strains 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (and 10^{-6} for *Candida albicans* tested under clean conditions). Take samples of 1,0 ml of each of the dilutions in duplicate and inoculate using pour plate or spread plate technique

5.5.3 Counting of the test mixtures

For the bacterial strains, incubate the plates at 36 °C \pm 1 °C or at 37 °C \pm 1 °C for 24 h.

For the fungal strains, incubate the plates at (30 \pm 1) °C for 18 h to 24 h (*Candida albicans*), for 42 h to 48 h (*Aspergillus brasiliensis*). Discard any plates which are not countable for any reason. Count the plates and determine the number of colony forming units. Incubate the plates for a further 18 h to 24 h. Do not recount plates which no longer show well-separated colonies. Recount the remaining plates. For *Aspergillus brasiliensis*, continue incubation for a further 18 h to 24 h and if necessary a further 18 h to 24 h, provided the number of countable colonies (discrete colonies) is increasing.

Record the number of colony forming units (Nts) remaining on the test surface.

Discard any plates that are not countable for any reason. Count the plates and determine the total number of cfu. Do not recount plates that no longer show well-separated colonies. Recount the remaining plates. If the number has increased, use only the higher number for further evaluation.

Only the plates showing a number of colonies included in a 15-300 for bacteria and yeast and 15-150 for mould range were used to perform the result calculation. A deviation of 10 % is accepted, so the limits are 14 and 330 for bacteria and yeast and 14-165 for mould.

Dalam pengujian, di mana jumlah cfu pada setiap cawan yang dihitung adalah <14 , jumlah cfu/ml harus dicatat sebagai $<1,4 \times 10^2$ ($<2,15$ Log). Di mana jumlah cfu pada setiap cawan yang dihitung > 330 atau 165 , jumlah cfu/ml harus dicatat sebagai $> 3,3 \times 10^5$ ($> 5,52$ Log) atau $> 1,6 \times 10^5$, ($> 5, 22$ Log).

Hitung Nc dan Nd angka log dari cfu yang diperoleh dari permukaan uji menggunakan persamaan berikut:

$$Nd \text{ (atau } Nc) = \log (c \times 10/n \times d) \quad (2)$$

dimana

- c adalah jumlah nilai V_c yang diperhitungkan;
- n adalah jumlah nilai V_c yang diperhitungkan;
- d adalah pengenceran diperhitungkan.

Jika satu atau kedua nilai duplikat V_c berada di bawah batas bawah atau di atas batas atas, nyatakan hasilnya sebagai "kurang dari" atau "lebih dari". Secara khusus, dalam pengujian, di mana jumlah cfu pada setiap cawan yang dihitung adalah <14 , jumlah cfu/ml harus dicatat sebagai $<1,4 \times 10^2$ ($<2,15$ Log). Dimana jumlah cfu pada setiap cawan yang dihitung > 330 atau 165 , jumlah cfu/ml harus dicatat sebagai $> 3,3 \times 10^5$ ($> 5,52$ Log) atau $> 1,6 \times 10^5$, ($> 5, 22$ Log).

Jika kedua nilai duplikat V_c adalah nol, diasumsikan bahwa jumlah (dalam ufc) kurang dari 5/ml dalam media netralisasi dan nilai $Na < 0,10$ harus digunakan.

Hitung NC dan NT angka log dari cfu yang diperoleh dari permukaan uji menggunakan persamaan berikut:

$$NC, NT = \log (c \times 10/n \times d) \quad (3)$$

where dimana

- c adalah jumlah nilai V_c yang diperhitungkan;
- n adalah jumlah nilai V_c yang diperhitungkan;
- d adalah pengenceran diperhitungkan.

5.6 Perhitungan dan ekspresi hasil

5.6.1 Uraian data: penghitungan nilai rata-rata tertimbang

Pembulatan hasil harus dilakukan dengan membulatkan nilai eksponensial ke dua angka signifikan.

Saat membulatkan angka: jika angka terakhir lebih tinggi dari atau sama dengan '5' maka angka sebelumnya meningkat ke satu unit; jika angka terakhir lebih rendah dari '5' maka angka sebelumnya tetap tidak berubah; lanjutkan dengan cara ini hingga mencapai dua angka penting.

Nilai lg dibulatkan menjadi dua angka penting desimal seperti yang ditunjukkan pada Lampiran B dan Lampiran C, Tabel C.1.

In the assay, where the number of cfu on every plate counted is < 14 , the number of cfu/ml should be recorded as $< 1,4 \times 10^2$ ($< 2,15$ Log). Where the number of cfu on every plate counted is > 330 or 165 , the number of cfu/ml should be recorded as $> 3,3 \times 10^5$ ($> 5,52$ Log) or $> 1,6 \times 10^5$, ($> 5,22$ Log).

Calculate N_d and N_c the log number of cfu recovered from the test surface using the following equation:

$$N_d \text{ (or } N_c) = \log (c \times 10/n \times d) \quad (2)$$

where

- c is the sum of V_c values taken into account;
- n is the number of V_c values taken into account;
- d is the dilution taken into account.

If one or both of the duplicate V_c values are either below the lower or above the upper limit, express the results as "less than" or "more than". In particular, in the assay, where the number of cfu on every plate counted is < 14 , the number of cfu/ml should be recorded as $< 1,4 \times 10^2$ ($< 2,15$ Log). Where the number of cfu on every plate counted is > 330 or 165 , the number of cfu/ml should be recorded as $> 3,3 \times 10^5$ ($> 5,52$ Log) or $> 1,6 \times 10^5$, ($> 5,22$ Log).

If both of the duplicate V_c values are zero, it is assumed that the count (in ufc) is less than 5/ml in the neutralization medium and an N_a value of $< 0,10$ should be used.

Calculate N_C and N_T the log number of cfu recovered from the test surface using the following equation:

$$N_C, N_T = \log (c \times 10/n \times d) \quad (3)$$

where

- c is the sum of V_c values taken into account;
- n is the number of V_c values taken into account;
- d is the dilution taken into account.

5.6 Calculation and expression of results

5.6.1 Elaboration of data: counting of weighed average values

Rounding of the results shall be performed by rounding the exponential values to two significant ciphers.

When rounding ciphers: if the last cipher is higher than or equal to '5' the previous cipher is increased of a unit; if the last cipher is lower than '5' the previous cipher remains unchanged; proceed this way until reaching two significant ciphers.

Log values are rounded to two decimal significant ciphers as shown in Annex B and Annex C, Table C.1.

Jika diamati perhitungan dari dua pengenceran berturut-turut berada pada kisaran 14-330 atau 14-165, maka nilai rata-rata tertimbang dihitung sebagai berikut:

$$(m + m' + n + n') / 2,2 \times V \times d \quad (4)$$

dengan:

- m, m' adalah dua replika pada pengenceran lebih rendah yang dinyatakan sebagai cfu;
- n, n' adalah dua replika pada pengenceran yang lebih tinggi yang dinyatakan sebagai cfu;
- V adalah volume inokulasi ke dalam cawan yang dinyatakan dalam ml;
- d adalah faktor pengenceran yang lebih rendah.

Jika tidak semua replika pada setiap pengenceran berada pada rentang 14-330 atau 14-165, rata-rata tertimbang akan memperhitungkan hal sebagai berikut:

Kasus 1: hanya m dan n yang berada pada rentang 14-330 atau 14-165, rumusnya akan berubah sebagai berikut:

$$(m + n) / 1,1 \times V \times d \quad (5)$$

Kasus 2: hanya m, m' dan n yang berada pada rentang 14-330 atau 14-165, rumusnya akan berubah sebagai berikut:

$$(m + m' + n) / 2,1 \times V \times d \quad (6)$$

Kasus 3: hanya m, n dan n' yang berada pada rentang 14-330 atau 14-165, rumusnya akan berubah sebagai berikut:

$$(m + n + n') / 1,2 \times V \times d \quad (7)$$

Kasus 4: hanya m yang berada pada rentang 14-330 atau 14-165, rumusnya akan berubah sebagai berikut:

$$m / V \times d \quad (8)$$

5.6.2 Verifikasi metodologi

Untuk setiap pengujian, periksa bahwa:

- a) jumlah rata-rata dari cawan duplikat yang digunakan untuk perhitungan N, Nc, Nd, NC, NT adalah antara 14 dan 330 untuk *strain* bakteri dan ragi dan 14 dan 165 untuk *strain* fungi;
- b) $6,57 \leq N \leq 7,10 \lg$ untuk bakteri (kecuali *Pseudomonas aeruginosa* yang akan diuji dalam kondisi bersih) dan *Candida albicans* untuk diuji dalam kondisi bersih;
- c) $7,57 \leq N \leq 8,10 \lg$ untuk *Pseudomonas aeruginosa* yang akan diuji dalam kondisi bersih;

If observed counts from two consecutive dilutions fall within the 14-330 or 14-165 range, then a weighted average value is calculated as follows:

$$(m + m' + n + n') / 2,2 \times V \times d \quad (4)$$

where

- m, m' are the two replicas at the lower dilution expressed as cfu;
- n, n' are the two replicas at the higher dilution expressed as cfu;
- V is the volume of the inoculated into the plate expressed in ml;
- d is the lower dilution factor.

In case not all the replicas at each dilution fall within the 14-330 or 14-165 range, the weighted average will take this into account as follows:

Case 1: only m and n fall within the 14-330 or 14-165 range, the formula will change as follows:

$$(m + n) / 1,1 \times V \times d \quad (5)$$

Case 2: only m, m' and n fall within the 14-330 or 14-165 range, the formula will change as follows:

$$(m + m' + n) / 2,1 \times V \times d \quad (6)$$

Case 3: only m, n and n' fall within the 14-330 or 14-165 range, the formula will change as follows:

$$(m + n + n') / 1,2 \times V \times d \quad (7)$$

Case 4: only m falls within the 14-330 or 14-165 range, the formula will change as follows:

$$m / V \times d \quad (8)$$

5.6.2 Verification of methodology

For each test, check that:

- a) the mean counts from duplicate plate used for calculation of N, Nc, Nd, NC, NT are between 14 and 330 for bacteria and yeast strains and 14 and 165 for mould strains;
- b) $6,57 \leq N \leq 7,10$ lg for bacteria (except *Pseudomonas aeruginosa* to be tested under clean conditions) and *Candida albicans* to be tested under clean conditions;
- c) $7,57 \leq N \leq 8,10$ lg for *Pseudomonas aeruginosa* to be tested under clean conditions;

- d) $5,57 \leq N \leq 6,10$ lg untuk *Candida albicans* yang akan diuji dalam kondisi kotor dan untuk *Aspergillus brasiliensis*;
- e) $NC - Nc$ tidak lebih dari $\pm 0,3$ lg;
- f) $NT - Nc$ tidak lebih dari $\pm 0,3$ lg;
- g) Nts (jumlah cfu sisa yang diperoleh dari permukaan uji) kurang dari 100 cfu untuk konsentrasi aktif. Jika tidak, pemulihan mikroorganisme belum cukup. Untuk konsentrasi non-aktif, Nts mungkin tidak dapat dihitung;
- h) kontrol penghitungan rata-rata tertimbang: hasil bagi tidak lebih rendah dari 5 dan tidak lebih tinggi dari 15. Ini hanya berlaku untuk perhitungan N;
- i) Nc harus cukup tinggi untuk menunjukkan pengurangan 4 lg untuk bakteri dan pengurangan 3 lg untuk fungi.

5.6.3 Pernyataan hasil

5.6.3.1 Pengurangan

Pengurangan (R) dinyatakan dalam logaritma.

Untuk setiap organisme uji catat jumlah cfu/ml dalam prosedur uji untuk aktivitas mikrobisida, produk (5.5.2.2) dan prosedur kontrol (5.5.2.3). " Untuk setiap konsentrasi produk dan setiap kondisi percobaan, hitung dan catat pengurangan log desimal (lg) secara terpisah menggunakan persamaan:

$$R = Nc - Nd \quad (9)$$

5.6.4 Kesimpulan

5.6.4.1 Aktivitas pada permukaan yang tidak berpori untuk tujuan umum

Aktivitas *bactericidal*, *fungicidal* dan/atau *yeasticidal* pada permukaan untuk tujuan umum ditandai dengan konsentrasi produk yang diuji yang memenuhi kriteria 5.6.1 dan 5.6.2 dan:

- yang menunjukkan penurunan viabilitas sebesar 4 lg atau lebih, dalam kondisi bersih atau kotor (lihat Pasal 4), bila organisme uji adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* dan *Escherichia coli*;

dan/atau

- yang menunjukkan penurunan viabilitas sebesar 3 lg atau lebih, dalam kondisi bersih atau kotor (lihat Pasal 4), bila organisme uji adalah *Candida albicans* dan *Aspergillus brasiliensis*;

dan/atau

- yang menunjukkan penurunan viabilitas 3 lg atau lebih, dalam kondisi bersih atau kotor (lihat Pasal 4), ketika organisme uji adalah *Candida albicans*.

- d) $5,57 \leq N \leq 6,10$ lg for *Candida albicans* to be tested under dirty conditions and for *Aspergillus brasiliensis*;
- e) NC - Nc is not greater than $\pm 0,3$ lg;
- f) NT - Nc is not greater than $\pm 0,3$ lg;
- g) Nts (number of residual cfu recovered from test surface) is less than 100 cfu for active concentrations. If not, the recovery of microorganisms has not been sufficient. For non-active concentrations, Nts may be not countable;
- h) control of weighted mean counts: quotient is not lower than 5 and not higher than 15. It applies only to N calculation;
- i) Nc shall be sufficiently high in order to demonstrate a 4 lg reduction for bacteria and a 3 lg reduction for fungi.

5.6.3 Expression of results

5.6.3.1 Reduction

The reduction (R) is expressed in logarithm.

For each test organism record the number of cfu/ml in the test procedure for microbicidal activity of the product (5.5.2.2) and the control procedure (5.5.2.3).” For each product concentration and each experimental condition, calculate and record the decimal log (lg) reduction separately using the equation:

$$R = Nc - Nd \quad (9)$$

5.6.4 Conclusion

5.6.4.1 Activity on non-porous surfaces for general purposes

Bactericidal, fungicidal and/or yeasticidal activity on surfaces for general purposes is characterized by the concentration of the tested product for which criteria 5.6.1 and 5.6.2 are met and:

- for which a 4 lg or more reduction in viability is demonstrated, under clean or dirty conditions (see Clause 4), when the test organisms are *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* and *Escherichia coli*;

and/or

- for which a 3 lg or more reduction in viability is demonstrated, under clean or dirty conditions (see Clause 4), when the test organisms are *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*;

and/or

- for which a 3 lg or more reduction in viability is demonstrated, under clean or dirty conditions (see Clause 4), when the test organisms are *Candida albicans*.

5.6.4.2 Aktivitas pada permukaan yang tidak berpori untuk tujuan tertentu

Aktivitas *bactericidal* dan/atau *fungicidal* atau *yeasticidal* pada permukaan untuk tujuan khusus dicirikan oleh konsentrasi produk yang diuji yang memenuhi kriteria 5.6.1 dan 5.6.2 dan yang:

- penurunan viabilitas 4 log atau lebih ditunjukkan, jika organisme uji adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* dan *Escherichia coli*, dan jika diperlukan organisme uji tambahan;

dan/atau yang :

- penurunan viabilitas sebesar 3 log atau lebih, bila organisme uji adalah *Candida albicans* dan *Aspergillus brasiliensis* (*ex A. niger*), dan jika diperlukan organisme uji tambahan;
- penurunan viabilitas 3 log atau lebih ditunjukkan, ketika organisme uji adalah *Candida albicans*, dan jika diperlukan organisme uji tambahan

dalam kondisi tambahan: t dalam menit, θ dalam derajat °C, kondisi bersih atau kotor dan zat pengganggu tambahan (lihat 5.5.1).

5.7 Laporan uji

Laporan pengujian harus mengacu pada standar ini.

Laporan uji harus menyatakan, minimum, informasi berikut:

- a) identitas laboratorium;
- b) identitas sampel;
 - 1) nama produk;
 - 2) nomer bets;
 - 3) pabrikan;
 - 4) tanggal pengiriman;
 - 5) kondisi penyimpanan;
 - 6) zat aktif dan konsentrasinya (opsional);
- c) kondisi percobaan;
 - 1) periode analisa;
 - 2) pengencer produk yang digunakan selama pengujian;
 - 3) konsentrasi uji produk;
 - 4) penampilan larutan produk;
 - 5) waktu kontak (s);
 - 6) suhu uji (s);
 - 7) zat pengganggu;
 - 8) reaksi antara inokulum dengan adanya zat pengganggu dan produk;
 - 9) suhu inkubasi;
 - 10) penetral *strain* bakteri dan fungi yang digunakan;

5.6.4.2 Activity on non-porous surfaces for specific purposes

Bactericidal and/or fungicidal or yeasticidal activity on surfaces for specific purposes is characterized by the concentration of the tested product for which criteria 5.6.1 and 5.6.2 are met and for which:

- a 4 log or more reduction in viability is demonstrated, when the test organisms are *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* and *Escherichia coli*, and if required additional test organisms;

and/or for which:

- a 3 log or more reduction in viability is demonstrated, when the test organisms are *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* (ex *A. niger*), and if required additional test organisms;
- a 3 log or more reduction in viability is demonstrated, when the test organisms are *Candida albicans*, and if required additional test organisms

under additional conditions: t in minutes, θ in degrees °C, clean or dirty conditions and additional interfering substances (see 5.5.1).

5.7 Test report

The test report shall refer to this standard.

The test report shall state, at least, the following information:

- a) identification of the laboratory;
- b) identification of the sample:
 - 1) name of the product;
 - 2) batch number;
 - 3) manufacturer;
 - 4) date of delivery;
 - 5) storage conditions;
 - 6) active substance(s) and their concentration(s) (optional);
- c) experimental conditions:
 - 1) period of analysis;
 - 2) product diluent used during the test;
 - 3) product test concentrations;
 - 4) appearance product dilutions;
 - 5) contact time(s);
 - 6) test temperature(s);
 - 7) interfering substance;
 - 8) reaction between the inoculum in the presence of interfering substances and product;
 - 9) temperature of incubation;
 - 10) neutralizer of the bacterial or fungal strains used;

- 11) identitas strain bakteri dan/fungi yang digunakan;
- 12) identitas permukaan uji;
- d) prosedur pengujian:
 - 1) rincian lengkap uji untuk validasi media netralisasi harus diberikan;
- e) hasil uji;
 - 1) uji validasi ;
 - 2) evaluasi aktivitas *bactericidal* dan/atau *fungicidal* dan/atau *yeasticidal*;
- f) kesimpulan;
- g) tempat, tanggal dan tanda tangan yang dikenali;

CATATAN Contoh laporan pengujian umum diberikan pada Lampiran C.1.

- 11) identification of the bacterial and/or fungal strains used;
- 12) identification of the test surface ;
- d) operating procedure:
 - 1) full details for the test for validation of the neutralization medium shall be given;
- e) test results;
 - 1) validation tests;
 - 2) evaluation of bactericidal and/or fungicidal and/or yeasticidal activity;
- f) conclusion;
- g) locality, date and identified signature (s).

NOTE An example of a typical test report is given in Annex C.1.

Lampiran A
(informatif)
Strain referensi yang sesuai

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	ATCC	15 442
	CIP	103 467
	DSM	939
	NCIB	10 421
<i>Staphylococcus aureus</i> :	ATCC	6 538
	CIP	4.83
	DSM	799
	NCTC	10 788
	NCIB	9 518
<i>Escherichia coli</i> :	ATCC	10 536
	CIP	54 127
	DSM	682
	NCTC	10 418
	NCIMB	8 879
<i>Enterococcus hirae</i> :	ATCC	10 541
	CIP	5 855
	DSM	3320
	NCIMB	8 192
<i>Salmonella typhimurium</i> :	ATCC	13 311
	CIP	5 858
	NCTC	74
<i>Lactobacillus brevis</i> :	DSM	6 235
	CIP	103 474
<i>Enterobacter cloacae</i> :	DSM	6 234
	CIP	104 674

Annex A
(informative)
Corresponding referenced strains

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	ATCC	15 442
	CIP	103 467
	DSM	939
	NCIB	10 421
<i>Staphylococcus aureus</i> :	ATCC	6 538
	CIP	4.83
	DSM	799
	NCTC	10 788
	NCIB	9 518
<i>Escherichia coli</i> :	ATCC	10 536
	CIP	54 127
	DSM	682
	NCTC	10 418
	NCIMB	8 879
<i>Enterococcus hirae</i> :	ATCC	10 541
	CIP	5 855
	DSM	3320
	NCIMB	8 192
<i>Salmonella typhimurium</i> :	ATCC	13 311
	CIP	5 858
	NCTC	74
<i>Lactobacillus brevis</i> :	DSM	6 235
	CIP	103 474
<i>Enterobacter cloacae</i> :	DSM	6 234
	CIP	104 674

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	ATCC	9 763
	IP	143 283
	DSM	1 333
	CBS	5 900
<i>Candida albicans</i> :	ATCC	10 231
	IP	4 872
	DSM	1386
	CBS	6 431
	NCTC	3 179
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ex <i>A. niger</i>):	ATCC	16 404
	DSM	1 988
	CBS	733.88
	IP	1 431.83
	NCTC	2 275
	CMI	149 007

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	ATCC	9 763
	IP	143 283
	DSM	1 333
	CBS	5 900
<i>Candida albicans</i> :	ATCC	10 231
	IP	4 872
	DSM	1386
	CBS	6 431
	NCTC	3 179
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ex <i>A. niger</i>):	ATCC	16 404
	DSM	1 988
	CBS	733.88
	IP	1 431.83
	NCTC	2 275
	CMI	149 007

Lampiran B
(informatif)
Penetral

Salah satu penetral berikut dapat digunakan:

- lecithin 3 g/l; *polysorbate 80*⁷⁾ 30 g/l; *sodium thiosulphate* 5 g/l; *L-histidine* 1 g/l; saponine 30 g/l dalam pengencer (lihat 5.2.2.4) atau dalam *buffer* fosfat 0,25 mol/l at 1 % (V/V);
- *buffer* fosfat 0,25 mol/l :
 - KH₂PO₄ 34 g;
 - air (lihat 5.2.2.2) 500 ml;
 - disesuaikan sampai pH 7,2 ± 0,2 menggunakan 1 mol/l NaOH;
 - air (lihat 5.2.2.2) sampai 1.000 ml ;
 - disterilisasi dalam autoklaf (lihat 5.3.1);
- kuning telur segar diencerkan menjadi 5% (V/V) atau 0,5% (V/V);
- 30 g/l *polysorbate 80*⁷⁾; 4 g/l *sodium lauryl sulphate*; *lecithin* 3g/l;
- 5% (V/V) kuning telur segar; 40 g/l *polysorbate 80*⁷⁾;
- 7 % (V/V) *ethylene oxide* kondensat dari *fatty alcohol* ; 20 g/l *lecithin*; 4 % (V/V) *polysorbate 80*⁷⁾;
- 4 % (V/V) *ethylene oxide* kondensat dari *fatty alcohol*; 4 g/l *lecithin*;
- 30 g/l *polysorbate 80*¹³⁾; *lecithin* 3 g/l; *L-histidine* 1 g/l;
- *glycine* sebagai fungsi konsentrasi produk;
- 30 g/l *polysorbate 80*⁷⁾; *lecithin* 3 g/l;
- Emulsi fosfolipid (komersial) dengan konsentrasi 50 mg/ml (dilarutkan 1 hingga 10);
- *sodium thioglycollate* dengan konsentrasi 0,5 g/l or 5 g/l;
- *L cysteine* dengan konsentrasi 0,8 g/l atau 1,5 g/l;
- Asam *thiomalic* pada konsentrasi 0,075 % (V/V) (d disesuaikan sampai pH 7 dengan NaOH);
- *sodium thiosulphate* pada konsentrasi 5 g/l;

⁷⁾ Kualitas analitis, tidak terhidrolisis sesuai dengan European Pharmacopoeia volume 1. TWEEN 80® adalah contoh produk cocok yang tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan demi kenyamanan pengguna standar ini dan bukan merupakan dukungan CEN terhadap produk ini.

Annex B (informative) Neutralizers

Any of the following neutralizers can be used:

- lecithin 3 g/l; polysorbate 80¹⁴⁾ 30 g/l; sodium thiosulphate 5 g/l; L-histidine 1 g/l; saponine 30 g/l in diluent (see 5.2.2.4) or in phosphate buffer 0,25 mol/l at 1 % (V/V);
- phosphate buffer 0,25 mol/l:
 - KH_2PO_4 34 g;
 - water (see 5.2.2.2) 500 ml;
 - adjusted to pH $7,2 \pm 0,2$ with 1 mol/l NaOH;
 - water (see 5.2.2.2) up to 1.000 ml;
 - sterilized in an autoclave (see 5.3.1);
- fresh egg yolk diluted to 5 % (V/V) or 0,5 % (V/V);
- 30 g/l polysorbate 807); 4 g/l sodium lauryl sulphate ; lecithin 3g/l;
- 5 % (V/V) fresh egg yolk; 40 g/l polysorbate 80⁷⁾;
- 7 % (V/V) ethylene oxide condensate of fatty alcohol ; 20 g/l lecithin; 4 % (V/V) polysorbate 807);
- 4 % (V/V) ethylene oxide condensate of fatty alcohol; 4 g/l lecithin;
- 30 g/l polysorbate 807); lecithin 3 g/l; L-histidine 1 g/l;
- glycine as a function of concentration of product;
- 30 g/l polysorbate 807); lecithin 3 g/l;
- phospholipid emulsion (commercial) at 50 mg/ml (diluted 1 to 10);
- sodium thioglycollate at 0,5 g/l or 5 g/l;
- L cysteine at 0,8 g/l or 1,5 g/l;
- thiomalic acid at 0,075 % (V/V) (adjusted to pH 7 with NaOH);
- sodium thiosulphate at 5 g/l;

⁷⁾ Analytical quality, non-hydrolysed in accordance with European Pharmacopoeia volume 1. TWEEN 80® is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of users of this standard and does not constitute an endorsement by CEN of this product.

- *catalase* atau *peroxidase*: Satu unit enzim ini mengkatalisis dekomposisi 1 μmol hidrogen peroksida per menit pada 25°C dan pada pH 7;
- *polysorbate 80*⁷⁾ 30 g/l ; *saponin* 30 g/l ; *L-histidine* 1 g/l ; *L-cysteine* 1g/l.

Daftar di atas tidak lengkap dan penetral lain dapat dicoba.

- catalase or peroxidase: One unit for of these enzymes catalyses the decomposition of 1 μmol of hydrogen peroxide per minutes at 25 °C and at pH 7;
- polysorbate 80⁷⁾ 30 g/l ; saponin 30 g/l ; L-histidine 1 g/l ; L-cysteine 1g/l.

The above list is not exhaustive and other neutralizers may be tried.

Lampiran C
(informatif)
Pernyataan hasil dengan pengenceran – metode netralisasi

Tabel C.1 — Hasil uji (1 dari 2)

Organisme uji	Suspensi uji bakteri atau fungi : N (Lihat 5.4.1.3)	Uji validasi :		Kontrol air : Nc (Lihat 5.5.3)	Prosedur uji pada konsentrasi % (V/V) (Lihat 5.5.2.1)		
		NT (Lihat Lampiran A)	NC (Lihat Lampiran A)		0.5	0.75	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10 ⁻⁶ : 229 ;216 10 ⁻⁷ : 20 ;17 N : 6,74	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 123 ;118 10 ⁻⁵ : 9 ;13 NT : 7,08	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 137 ;142 10 ⁻⁵ : 11 ;4 NC : 7,14	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 153 ;123 10 ⁻⁵ : 14 ;9 Nc : 7,14 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 160 ;138 10 ⁻² : 13 ;17 Nd : 4,18 Nts : > 100 R : 2,96	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 12 R : > 6,04	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R : > 7,04
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : 230 ;210 10 ⁻⁷ : 23 ;19 N : 6,74	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 132 ;113 10 ⁻⁵ : 9 ;2 NT : 7,09	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 143 ;122 10 ⁻⁵ : 22 ;11 NC : 7,14	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 155 ;121 10 ⁻⁵ : 18 ;23 Nc : 7,15 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 166 ;144 10 ⁻² : 22 ;18 Nd : 4,20 Nts : > 100 R : 2,95	10 ⁻⁰ : 210 ;198 10 ⁻¹ : 27 ;19 10 ⁻² : 5 ;2 Nd : 3,65 Nts : 0 R : 3,50	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R : > 7,05

Annex C
(informative)
Expression of results with the dilution-neutralization method

Tabel C.1 —Test results (1 of 2)

Test organisms	Bacterial or fungal test suspension : N (See 5.4.1.3)	Validation test :		Water control : Nc (See 5.5.3)	Test procedure at concentrations % (V/V) (See 5.5.2.1)		
		NT (See Annex A)	NC (See Annex A)		0.5	0.75	1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10 ⁻⁶ : 229 ;216 10 ⁻⁷ : 20 ;17 N : 6,74	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 123 ;118 10 ⁻⁵ : 9 ;13 NT : 7,08	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 137 ;142 10 ⁻⁵ : 11 ;4 NC : 7,14	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 153 ;123 10 ⁻⁵ : 14 ;9 Nc : 7,14 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 160 ;138 10 ⁻² : 13 ;17 Nd : 4,18 Nts : > 100 R : 2,96	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 12 R : > 6,04	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R : > 7,04
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : 230 ;210 10 ⁻⁷ : 23 ;19 N : 6,74	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 132 ;113 10 ⁻⁵ : 9 ;2 NT : 7,09	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 143 ;122 10 ⁻⁵ : 22 ;11 NC : 7,14	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 155 ;121 10 ⁻⁵ : 18 ;23 Nc : 7,15 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 166 ;144 10 ⁻² : 22 ;18 Nd : 4,20 Nts : > 100 R : 2,95	10 ⁻⁰ : 210 ;198 10 ⁻¹ : 27 ;19 10 ⁻² : 5 ;2 Nd : 3,65 Nts : 0 R : 3,50	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R : > 7,05

Tabel C.1 — Hasil uji (2 dari 2)

Organisme uji	Suspensi uji bakteri atau fungi : N (Lihat 5.4.1.3)	Uji validasi :		Kontrol air : Nc (Lihat 5.5.3)	Prosedur uji pada konsentrasi % (V/V) (Lihat 5.5.2.1)		
		NT (Lihat Lampiran A)	NC (Lihat Lampiran A)		0.5	0.75	1.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : 227 ;202 10 ⁻⁷ : 18 ;23 N : 6,72	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 166 ;134 10 ⁻⁵ : 15 ;11 NT : 7,18	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 158 ;144 10 ⁻⁵ : 13 ;8 NC : 7,18	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 162 ;146 10 ⁻⁵ : 12 ;16 Nc : 7,19 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 265 ;240 10 ⁻² : 33 ;28 Nd : 4,41 Nts : > 100 R: 2,78	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 63 ;52 10 ⁻² : 4 ;7 Nd : 3,76 Nts : 23 R: 3,43	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R: > 7,09
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10 ⁻⁶ : 235 ;255 10 ⁻⁷ : 29 ;31 N : 7,09	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 198 ;178 10 ⁻⁵ : 27 ;18 NT : 7,28	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 201 ;187 10 ⁻⁵ : 17 ;24 NC : 7,29	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 194 ;179 10 ⁻⁵ : 23 ;19 Nc : 7,28 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : > 300 ; > 300 10 ⁻² : 127 ;132 Nd : 5,11 Nts : > 100 R: ...	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 128 ;145 10 ⁻² : 9 ;13 Nd : 4,14 Nts : 8 R: ...	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R: > ...

Tabel C.1 – Test results (2 of 2)

Test organisms	Bacterial or fungal test suspension : N (See 5.4.1.3)	Validation test :		Water control : Nc (See 5.5.3)	Test procedure at concentrations % (V/V) (See 5.5.2.1)		
		NT (See Annex A)	NC (See Annex A)		0.5	0.75	1.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : 227 ;202 10 ⁻⁷ : 18 ;23 N : 6,72	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 166 ;134 10 ⁻⁵ : 15 ;11 NT : 7,18	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 158 ;144 10 ⁻⁵ : 13 ;8 NC : 7,18	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 162 ;146 10 ⁻⁵ : 12 ;16 Nc : 7,19 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 265 ;240 10 ⁻² : 33 ;28 Nd : 4,41 Nts : > 100 R: 2,78	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 63 ;52 10 ⁻² : 4 ;7 Nd : 3,76 Nts : 23 R: 3,43	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R: > 7,09
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10 ⁻⁶ : 235 ;255 10 ⁻⁷ : 29 ;31 N : 7,09	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 198 ;178 10 ⁻⁵ : 27 ;18 NT : 7,28	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 201 ;187 10 ⁻⁵ : 17 ;24 NC : 7,29	10 ⁻³ : > 330 ; > 330 10 ⁻⁴ : 194 ;179 10 ⁻⁵ : 23 ;19 Nc : 7,28 Nts : > 100	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : > 300 ; > 300 10 ⁻² : 127 ;132 Nd : 5,11 Nts : > 100 R: ...	10 ⁻⁰ : > 330 ; > 330 10 ⁻¹ : 128 ;145 10 ⁻² : 9 ;13 Nd : 4,14 Nts : 8 R: ...	10 ⁻⁰ : 0 ;0 10 ⁻¹ : 0 ;0 10 ⁻² : 0 ;0 Nd : < 0,10 Nts : 0 R: > ...

Lampiran D
(informatif)
Aktivitas *bactericidal* di permukaan pada kondisi penggunaan umum
(untuk kondisi bersih)

- a) Identitas laboratorium uji *Besson test house*;
- b) Identitas sampel :
- | | |
|--|------------------------------------|
| Nama produk | Z |
| Nomer bets | 94-71-51 |
| Pabrikan | <i>Centipede Formulations Inc</i> |
| Tanggal pengiriman | 1995-02-11 |
| Kondisi penyimpanan | suhu kamar dan dalam kondisi gelap |
| Produk pengencer yang direkomendasikan oleh pabrikan untuk digunakan | Air minum |
| Zat aktif dan konsentrasinya (opsional) | Tidak ditunjukkan |
- c) Metode uji dan validasinya :
- | | |
|----------------|--|
| Metode | Netralisasi pengenceran ; |
| Penetral | 30 g/l, lecithin, disterilisasi dalam autoklaf ; |
- d) Kondisi percobaan :
- | | |
|--|--|
| Periode analisa | 1994-02-20 sampai 1994-03-12 |
| Produk pengencer yang digunakan selama pengujian | air sadah steril 300 mg/kg CaCO ₃ |
| Konsentrasi produk uji | 2 g/l, 4 g/l dan 8 g/l |
| Penampilan pengenceran produk | Tidak berwarna, larutan bening |
| Zat pengganggu | 0.3 g/l <i>bovine albumin</i> (0.85 % susu skim untuk <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) |
| Suhu uji | θ = antara 18°C dan 25 °C |
| Waktu kontak | t = 5 menit \pm 10 detik |
| Suhu inkubasi | 37 °C \pm 1 °C |
| Identitas <i>strain</i> bakteri yang digunakan | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15 442
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10 536
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6 538
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10 541 |
- e) Hasil uji :
Lihat Tabel C.1.
- f) Kesimpulan :

Annex D
(informative)

Bactericidal activity in surfaces in general use conditions (for clean conditions)

a) Identification of the test laboratory	Besson test house;
b) Identification of the sample:	
Name of the product	Z
Batch number	94-71-51
Manufacturer	Centipede Formulations Inc
Date of delivery	1994-02-11
Storage conditions	room temperature and darkness
Product diluent recommended by the manufacturer for use	Potable water
Active substance(s) and its (their) concentration(s) (optional)	Not indicated
c) Test method and its validation:	
Method	Dilution neutralization;
Neutralizer	30 g/l, lecithin, sterilized in the autoclave ;
d) Experimental conditions:	
Period of analysis	1994-02-20 to 1994-03-12
Product diluent used during the test.....	sterile hard water 300 mg/kg CaCO ₃
Product test concentrations	2 g/l, 4 g/l and 8 g/l
Appearance product dilutions	colourless, clear solution
Interfering substances.....	0.3 g/l of bovine albumin (0.85 % skimmed milk fo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Test temperature	θ = between 18 °C and 25 °C
Contact time	t = 5 min \pm 10 s
Temperature of incubation	37 °C \pm 1 °C
Identification of the bacterial strains used.....	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15 442 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10 536 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6 538 <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10 541
e) Test results:	
See Table C.1.	
f) Conclusion:	

Sesuai dengan standar ini, batch 94–71–51 produk Z, bila diencerkan pada 1% (V/V), dalam air sadah, memiliki aktivitas *bactericidal* pada permukaan selama 5 menit pada suhu 20°C dalam kondisi bersih 0,3 g/l *bovine albumin* untuk *strain* acuan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Enterococcus hirae* dan 0,85% susu skim untuk *strain* acuan *Pseudomonas aeruginosa*.

g) Tempat, tanggal dan tanda tangan yang dikenali.

Catatan Produk uji, batch N° dan pabrikan diberikan sebagai contoh saja.

In accordance with this standard the batch 94–71–51 of the product Z, when diluted at 1 % (V/V), in hard water, possesses bactericidal activity on surfaces in 5 min at 20 °C under clean conditions 0,3 g/l bovine albumin for referenced strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus hirae* and 0,85 % skimmed milk for reference strain *Pseudomonas aeruginosa*.

g) Locality, date and identified signature.

NOTE The test product, batch N° and manufacturer are given as imaginary examples only.

Lampiran E
(informatif)
Ketepatan hasil uji

Rumus yang digunakan untuk penghitungan ketepatan hasil pengujian dapat ditemukan di EN 1040: 2005, Lampiran E. Jumlah pengulangan yang memberikan ketepatan faktor reduksi perlu ditetapkan dengan studi kolaboratif yang sesuai. Panduan untuk interpretasi hasil uji mengenai ketepatannya dan jumlah pengulangan uji diberikan pada EN 14885.

Annex E
(informative)
Precision of the test result

The formula used for the calculation of the precision of the test results can be found in EN 1040:2005, Annex E. The number of repetitions which give a precision of the reduction factor need to be established by appropriate collaborative studies. A guidance to the interpretation of the test results concerning their precision and the number of test repetitions is given in the EN 14885.

Bibliografi

- [1] EN 1040:2005, *Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics — Test method and requirements (phase 1)*
- [2] EN 10088-1, *Stainless steels — Part 1: List of stainless steels*
- [3] EN 10088-2, *Stainless steels — Part 2: Technical delivery conditions for sheet/plate and strip of corrosion resisting steels for general purposes*

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. Pascha Wijaya
7. Anggiat Yonathan Amazia
8. Merryani Girsang
9. Aprisunadi
10. Toto Waluyadi
11. Muhidin
12. Lisa Amelia
13. Rahmana Emran
Kartasasmita

[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