

RSNI3

RSNI3 ISO 21149:2017
(Ditetapkan oleh BSN tahun 2024)

Rancangan Standar Nasional Indonesia 3

Kosmetik – Mikrobiologi – Enumerasi dan deteksi bakteri mesofili aerob

(ISO 21149:2017 dan ISO 21149:2017/Amd1:2022, IDT)

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Prinsip	2
5 Pengencer, penetral, dan media kultur	3
6 Peralatan dan alat gelas	8
7 Strain mikroorganisme	8
8 Penanganan produk kosmetik dan sampel laboratorium	8
9 Prosedur	8
10 Penghitungan jumlah koloni (angka lempeng dan metode penyaringan membran)	8
11 Deteksi pertumbuhan (metode pengayaan)	8
12 Pernyataan hasil	8
13 Netralisasi kandungan antimikroba produk	8
14 Laporan hasil uji	8
Lampiran A (informatif) Pengencer netralisasi lainnya	19
Lampiran B (informatif) Pengencer lainnya	2
Lampiran C (informatif) Media kultur lainnya	3
Lampiran D (informatif) Penetral aktivitas antimikroba pengawet dan cairan pembilas	6
Bibliografi	7
Tabel D.1	6

Prakata

SNI ISO 21149:2017, dengan judul *Kosmetik – Mikrobiologi – Enumerasi dan deteksi bakteri mesofili aerob*, merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ISO 21149:2017, *Cosmetics – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria* dengan menambahkan ISO 21149:2017/Amd1:2022, dengan metode adopsi terjemahan satu bahasa dan ditetapkan oleh BSN pada tahun 2024.

Dalam standar ini, istilah “*this International Standard*” pada ISO 21149:2017 yang diadopsi diganti dengan “*this Standard*” dan diterjemahkan menjadi “Standar ini”.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 71-07, Kosmetik. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 4 Juni 2024 secara daring yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 12 Juni 2024 sampai dengan 26 Juni 2024 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Dalam standar ini digunakan kosakata yang mempunyai maksud tertentu, yaitu:

- “harus” yang artinya disyaratkan.
- “sebaiknya” yang artinya direkomendasikan.

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya, yaitu ISO 21149:2017 dan ISO 21149:2017/Amd1:2022, 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.

Kosmetik – Mikrobiologi – Enumerasi dan deteksi bakteri mesofili aerob

1 Ruang lingkup

Standar ini memberikan pedoman umum untuk enumerasi dan deteksi bakteri mesofili aerob yang terdapat dalam kosmetik

- dengan menghitung koloni pada media agar setelah inkubasi aerob, atau
- dengan memeriksa tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah pengayaan.

Karena banyaknya variasi produk kosmetik dalam bidang penerapan ini, metode ini mungkin tidak sesuai untuk beberapa produk (misalnya produk tertentu yang tidak larut air). Metode lain (misal: otomatisasi/*automated*) dapat menggantikan pengujian yang terdapat dalam standar ini dengan ketentuan kesetaraannya telah dibuktikan atau metode tersebut telah terbukti sesuai.

Jika diperlukan, mikroorganisme yang dihitung atau dideteksi dapat diidentifikasi menggunakan uji identifikasi yang sesuai dijelaskan dalam standar yang diuraikan dalam Bibliografi.

Untuk menjamin kualitas dan keamanan produk bagi konsumen, disarankan untuk melakukan analisis risiko mikrobiologi yang tepat untuk menentukan jenis produk kosmetik yang mana standar ini dapat diterapkan. Produk yang dianggap memiliki risiko mikrobiologi yang rendah (lihat ISO 29621) mencakup produk dengan aktivitas air rendah, produk hidro-alkohol, nilai pH ekstrem, dll.

2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya).

ISO 21148:2017, *Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination*

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*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini berlaku.

ISO dan IEC memelihara basis data terminologi untuk digunakan dalam standardisasi pada alamat berikut:

- Platform penelusuran *online* ISO : tersedia di <http://www.iso.org/obp>
- *IEC Electropedia* : tersedia di <http://www.electropedia.org/>

3.1

bakteri mesofili aerob

bakteri mesofili tumbuh secara aerob pada kondisi yang ditentukan dalam standar ini

Catatan 1 untuk entri: Dalam kondisi yang dijelaskan, jenis mikroorganisme lain (misalnya khamir, kapang) dapat dideteksi.

3.2

produk

bagian dari produk kosmetik teridentifikasi yang diterima di laboratorium untuk pengujian

3.3

sampel

sebagian produk (3.2) (setidaknya 1 g atau 1 ml) yang digunakan dalam pengujian untuk membuat suspensi awal (3.4)

3.4

suspensi awal

suspensi (atau larutan) sampel (3.3) dalam volume tertentu dari cairan yang sesuai (pengencer, penetral, *broth* atau kombinasi keduanya)

3.5

pengenceran sampel

pengenceran suspensi awal (3.4)

4 Prinsip

4.1 Umum

Metode ini mencakup enumerasi koloni pada media agar non-selektif atau dengan adanya atau tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah pengayaan. Kemungkinan penghambatan pertumbuhan mikroba oleh sampel harus dinetralkan untuk memungkinkan deteksi mikroorganisme hidup^[7]. Dalam semua kasus dan metodologi apa pun, netralisasi sifat antimikroba produk harus diperiksa dan dibuktikan (lihat Pasal 13)^{[8][9][10]}.

4.2 Penghitungan cawan

Penghitungan cawan terdiri dari langkah-langkah berikut.

- a) Penyiapan cawan tuang atau cawan sebar, menggunakan media kultur tertentu, dan inokulasi cawan menggunakan suspensi awal atau pengenceran produk dalam jumlah tertentu.
- b) Inkubasi aerob cawan pada suhu $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama $72\text{ jam} \pm 6\text{ jam}$.
- c) Menghitung jumlah unit pembentuk koloni (*colony forming unit*/CFU) dan menghitung jumlah bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram produk.

4.3 Filtrasi membran

Filtrasi membran terdiri dari langkah-langkah berikut.

- a) Pindahkan sejumlah sampel yang disiapkan sebagaimana dijelaskan pada Pasal 13 dalam peralatan filtrasi yang dibasahi dengan sedikit pengencer steril yang sesuai, segera

saring dan cuci sesuai prosedur yang dijelaskan (lihat 13.3.4). Pindahkan membran filter ke permukaan media agar yang ditentukan sebagaimana ditentukan dalam ISO 21148.

- b) Inkubasi aerob membran pada $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 72 jam \pm 6 jam.
- c) Menghitung jumlah unit pembentuk koloni (*colony forming unit/CFU*) dan menghitung jumlah bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram produk.

4.4 Deteksi bakteri dengan pengayaan

Deteksi bakteri dengan pengayaan terdiri dari langkah-langkah berikut.

- a) Inkubasi pada suhu $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama paling sedikit 20 jam suspensi awal dalam jumlah tertentu dalam media cair non-selektif yang mengandung penetral dan/atau bahan pendispersi yang sesuai.
- b) Pemindahan suspensi sebelumnya dalam jumlah tertentu ke media agar padat non-selektif.
- c) Inkubasi aerob pada suhu $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam hingga 72 jam.
- d) Deteksi pertumbuhan dan hasil dinyatakan sebagai "ada/tidaknya" bakteri mesofili aerob per sampel S produk.

5 Pengencer, penetral, dan media kultur

5.1 Umum

Petunjuk umum diberikan dalam ISO 21148. Jika air disebutkan dalam dokumen, gunakan air suling atau air yang dimurnikan seperti yang ditentukan dalam ISO 21148.

Pengencer, penetralisir, dan media kultur berikut ini cocok untuk enumerasi dan deteksi bakteri mesofili aerob. Pengencer, penetralisir, dan media kultur lainnya dapat digunakan jika telah terbukti sesuai untuk digunakan.

5.2 Pengencer dengan penetral dan pengencer

5.2.1 Umum

Pengencer digunakan untuk mendispersikan sampel. Ini mungkin mengandung penetralisir jika spesimen yang akan diuji memiliki sifat antimikroba. Keberhasilan netralisasi harus dibuktikan sebelum penentuan penghitungan (lihat Pasal 13). Informasi mengenai penetral yang sesuai diberikan pada Lampiran D.

5.2.2 Pengencer dengan penetral

5.2.2.1 Media cair *casein digest–soy lecithin–polysorbate 20 (SCDLP 20)*

5.2.2.1.1 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	20,0 g
<i>Soy lecithin</i>	5,0 g
Polisorbat 20	40,0 ml
Air	960,0 ml

5.2.2.1.2 Penyiapan

Larutkan polisorbat 20 dalam 960 ml air dengan cara mencampur sambil dipanaskan dalam penangas air pada suhu $49\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tambahkan *pancreatic digest of casein* dan *soy lecithin*. Panaskan sekitar 30 menit hingga larut. Campur dan tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,3 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

5.2.2.2 Pengencer dengan penetral lainnya

Pengencer dengan penetral lainnya dapat digunakan jika sesuai (lihat Lampiran A dan Lampiran D).

5.2.3 Pengencer

5.2.3.1 Cairan A

5.2.3.1.1 Komposisi

<i>Peptic digest of animal tissue</i>	1,0 g
Air	1 000 ml

5.2.3.1.2 Penyiapan

Larutkan 1 g pepton hingga 1 liter air. Panaskan dengan sering diaduk. Tuang ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,1 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

5.2.3.2 Pengencer lainnya

Pengencer lain boleh digunakan jika sesuai (lihat Lampiran B).

5.3 Pengencer untuk suspensi bakteri (larutan *tryptone* natrium klorida)

5.3.1 Komposisi

<i>Tryptone, pancreatic digest of casein</i>	1,0 g
Natrium klorida	8,5 g
Air	1 000 ml

5.3.2 Penyiapan

Larutkan komponen dalam air dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Tuang ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

5.4 Media kultur

5.4.1 Umum

Media kultur dapat disiapkan sebagai berikut atau menggunakan media kultur dehidrat sesuai dengan instruksi dari pabriknya. Media siap pakai dapat digunakan bila komposisi dan/atau hasil pertumbuhannya sebanding dengan komposisi yang diberikan di sini.

5.4.2 Media kultur untuk penghitungan

5.4.2.1 Media *Soybean–casein digest agar (SCDA)* atau *tryptic soy agar (TSA)*

5.4.2.1.1 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15,0 g
<i>Papaic digest of soybean meal</i>	5,0 g
Natrium klorida	5,0 g
Agar	15,0 g
Air	1 000 ml

5.4.2.1.2 Penyiapan

Larutkan komponen atau media lengkap dehidrat dalam air dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan $7,3 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

5.4.2.2 Media lain untuk penghitungan

Media lain boleh digunakan jika sesuai (lihat Lampiran C).

5.4.3 Media kultur untuk deteksi

5.4.3.1 Umum

Jika dipilih, media pengayaan dan media agar harus digunakan untuk mendeteksi bakteri.

Media pengayaan digunakan untuk mendispersikan sampel dan meningkatkan populasi mikroba awal. Ini mungkin mengandung penetralisir jika spesimen yang akan diuji memiliki sifat antimikroba.

5.4.3.2 Media pengayaan

5.4.3.2.1 Eugon LT100 *broth*

5.4.3.2.1.1 Umum

Media ini mengandung bahan-bahan:

- yang menetralkan zat penghambat yang ada dalam sampel: lesitina dan polisorbitat 80, dan
- bahan pendispersi: *octoxynol 9*.

5.4.3.2.1.2 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15,0 g
<i>Papaic digest of soybean meal</i>	5,0 g
L-cystine	0,7 g
Natrium klorida	4,0 g
Natrium sulfit	0,2 g
Glukosa	5,5 g
Lesitina telur	1,0 g
Polisorbitat 80	5,0 g
<i>Octoxynol 9</i>	1,0 g
Air	1 000 ml

5.4.3.2.1.3 Penyiapan

Larutkan berturut-turut polisorbitat 80, *octoxynol 9* dan lesitina telur ke dalam air mendidih hingga larut sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

5.4.3.2.2 Modified Eugon LT broth

5.4.3.2.2.1 Umum

Modified Eugon LT broth dapat digunakan sebagai alternatif.

5.4.3.2.2.2 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15 g
<i>Papaic digest of soybean meal</i>	5 g
Natrium klorida	4 g
L-cystine	0,7 g
Natrium sulfit	0,2 g
Glukosa	5,5 g
Lesitina telur	1 g
Polisorbitat 80	15 g
Natrium lauril eter sulfat	1,56 g
Air	1 000 ml

5.4.3.2.2.3 Penyiapan

Larutkan berturut-turut ke dalam air mendidih polisorbit 80 dan lesitina telur sampai larut sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Aduk rata setelah sterilisasi selagi cairan masih panas untuk melarutkan kembali zat yang mengendap. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ bila diukur pada suhu ruang.

5.4.3.3 Media agar untuk deteksi

5.4.3.3.1 Media agar Eugon LT100

5.4.3.3.1.1 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15,0 g
<i>Papaic digest of soybean meal</i>	5,0 g
<i>L-cystine</i>	0,7 g
Natrium klorida	4,0 g
Natrium sulfit	0,2 g
Glukosa	5,5 g
Lesitina telur	1,0 g
Polysorbate 80	5,0 g
<i>Octoxynol 9</i>	1,0 g
Agar	15,0 g
Air	1 000 ml

5.4.3.3.1.2 Penyiapan

Larutkan berturut-turut polisorbit 80, *octoxynol 9* dan lesitina telur ke dalam air mendidih hingga larut sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Aduk perlahan untuk mencegah timbulnya buih. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

5.4.3.3.2 Agar Modified Eugon LT

5.4.3.3.2.1 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15 g
<i>Papaic digest of soybean meal</i>	5 g
Natrium klorida	4 g
<i>L-cystine</i>	0,7 g
Natrium sulfit	0,2 g
Glukosa	5,5 g
Lesitina telur	1 g

Polisorbat 80	15 g
Natrium lauril eter sulfat	1,56 g
Agar	15 g
Air	1 000 ml

5.4.3.3.2 Penyiapan

Larutkan berturut-turut ke dalam air mendidih polisorbata 80 dan lesitina telur sampai larut sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Aduk rata setelah sterilisasi selagi cairan masih panas untuk melarutkan kembali zat yang mengendap. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ bila diukur pada suhu ruang.

5.4.3.3.3 Media agar lainnya untuk deteksi

Media lain dapat digunakan jika sesuai (lihat Lampiran C).

5.4.4 Media agar untuk kultivasi *strain* acuan

Gunakan media agar *soybean-casein digest agar medium* (SCDA) or *tryptic soy agar* (TSA) (5.4.2.1).

6 Peralatan dan alat gelas

Perlengkapan laboratorium, peralatan dan alat gelas diuraikan dalam ISO 21148.

7 *Strain* mikroorganisme

Untuk menguji keberhasilan penetral, digunakan dua *strain* yang masing-masing mewakili mikroorganisme Gram negatif dan Gram positif:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC¹⁾ 9027 (*strain* setara: CIP²⁾ 82.118 atau NCIMB³⁾ 8626 atau NBRC⁴⁾ 13275 atau KCTC⁵⁾ 2513 atau *strain* koleksi nasional setara lainnya);
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*strain* setara: CIP 4.83 atau NCIMB 9518 atau NBRC 13276 atau KCTC 1916 atau *strain* koleksi nasional setara lainnya).

Alternatif untuk *strain* Gram negatif mungkin adalah *Escherichia coli* ATCC 8739 (*strain* setara: CIP 53.126 atau NCIMB 8545 atau NBRC 3972 atau KCTC 2571 atau *strain* koleksi nasional setara lainnya).

Kultur sebaiknya ditumbuhkan kembali sesuai dengan prosedur yang disediakan oleh pemasok *strain* acuan.

Strain boleh disimpan di laboratorium sesuai dengan EN 12353.

-
- 1) ATCC = *American Type Culture Collection*.
 - 2) CIP = *The Collection of Institut Pasteur*.
 - 3) NCIMB = *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria*.
 - 4) NBRC = *Biological Resource Center, NITE*.
 - 5) KCTC = *Korean Collection for Type Cultures*.

8 Penanganan produk kosmetik dan sampel laboratorium

Jika perlu, simpan produk yang akan diuji pada suhu ruangan. Jangan menginkubasi, mendinginkan, atau membekukan produk (3.2) dan sampel (3.2) sebelum atau setelah analisis.

- 6)
- 7)
- 8)
- 9)
- 10)

Pengambilan sampel produk kosmetik yang akan dianalisis sebaiknya dilakukan, seperti yang diuraikan dalam ISO 21148. Analisis sampel sebagaimana ditentukan dalam ISO 21148 dan sesuai dengan prosedur yang diuraikan dalam Pasal 9.

9 Prosedur

9.1 Rekomendasi umum

Gunakan bahan, peralatan, dan teknik aseptik yang steril untuk menyiapkan sampel, suspensi awal, dan pengenceran. Dalam hal penyiapan suspensi awal, waktu yang harus dipenuhi saat inokulum bersentuhan dengan media kultur hingga akhir penyiapan harus tidak lebih dari 45 menit, kecuali disebutkan secara khusus dalam protokol atau dokumen yang ditetapkan.

9.2 Penyiapan suspensi awal

9.2.1 Umum

Suspensi awal dibuat dari sampel minimal 1 g atau 1 ml produk tercampur rata yang diuji.

Catat *S*, massa atau volume sampel yang tepat.

Suspensi awal biasanya merupakan pengenceran 1:10. Volume pengencer atau media pengayaan yang lebih besar mungkin diperlukan jika diperkirakan tingkat kontaminasi yang tinggi dan/atau jika sifat antimikroba masih ada dalam pengenceran 1:10.

9.2.2 Produk yang larut air

Pindahkan sampel (*S*) produk ke volume yang sesuai (misalnya 9 ml) pengencer dengan penetral (5.2.2) atau pengencer (5.2.3) atau media pengayaan (5.4.3.2), tergantung pada metode yang digunakan (lihat 9.3 atau 9.4).

Catat faktor pengenceran *d*.

9.2.3 Produk yang tidak larut dengan air

Pindahkan sampel (*S*) produk ke wadah yang sesuai yang berisi bahan pelarut dalam jumlah yang sesuai (misalnya polisorbate 80). Sebarkan sampel ke dalam bahan pelarut dan tambahkan volume yang sesuai (misalnya 9 ml) pengencer dengan penetral (5.2.2) atau pengencer (5.2.3) atau media pengayaan (5.4.3.2), tergantung pada metode yang digunakan (lihat 9.3 atau 9.4).

Catat faktor pengenceran *d*.

9.3 Metode penghitungan

9.3.1 Pengenceran untuk metode penghitungan

Biasanya, suspensi awal merupakan pengenceran pertama yang dihitung. Jika diperlukan, pengenceran berseri tambahan (misalnya pengenceran 1:10) boleh dilakukan dari suspensi awal menggunakan pengencer yang sama (sesuai dengan tingkat kontaminasi produk yang diharapkan).

Umumnya, penghitungan dilakukan dengan menggunakan setidaknya dua cawan petri. Namun dimungkinkan untuk menggunakan hanya satu cawan petri jika dilakukan pengujian rutin, atau jika penghitungan dilakukan berdasarkan pengenceran berturut-turut dari sampel yang sama atau berdasarkan hasil sebelumnya.

9.3.2 Metode penghitungan cawan

9.3.2.1 Metode cawan tuang

Dalam cawan petri berdiameter 85 mm hingga 100 mm, tambahkan 1 ml suspensi awal dan/atau pengenceran sampel yang dibuat seperti dijelaskan dalam Pasal 13 dan tuang 15 ml hingga 20 ml media agar cair (5.4.2) yang disimpan dalam penangas air pada suhu tidak lebih dari 48 °C. Jika cawan petri yang digunakan lebih besar, jumlah media agar juga ditambah.

Campurkan suspensi awal dan/atau pengenceran sampel dengan media, putar atau miringkan cawan dengan hati-hati untuk meratakannya. Biarkan campuran dalam cawan petri memadat pada permukaan horizontal pada suhu ruang.

9.3.2.2 Metode cawan sebar

Dalam cawan petri berdiameter 85 mm hingga 100 mm, masukkan 15 ml hingga 20 ml media agar cair (5.4.2) yang disimpan dalam penangas air pada suhu tidak lebih dari 48 °C. Jika cawan petri yang lebih besar digunakan, volume agar juga ditingkatkan. Biarkan cawan mendingin dan memadat, misalnya di dalam kabinet mikrobiologi atau di dalam inkubator. Sebarkan pada permukaan media volume terukur tidak kurang dari 0,1 ml suspensi awal dan/atau pengenceran sampel yang dibuat seperti dijelaskan dalam Pasal 13.

9.3.2.3 Metode filtrasi membran

Gunakan membran yang mempunyai ukuran pori tidak lebih besar dari 0,45 µm.

Pindahkan suspensi awal atau pengenceran sampel yang dibuat seperti dijelaskan dalam Pasal 13 dalam jumlah yang sesuai (sebaiknya mewakili setidaknya 1 g atau 1 ml produk) ke permukaan membran. Segera saring dan cuci membran (ikuti prosedur uji kesesuaian; lihat Pasal 13).

Pindahkan membran ke permukaan media agar (5.4.2).

9.3.2.4 Inkubasi

Kecuali dinyatakan lain, balikkan cawan yang telah diinokulasi dan masukkan ke dalam inkubator yang diatur pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 72 jam ± 6 jam. Setelah inkubasi, cawan tersebut, jika memungkinkan, harus segera diamati. Jika tidak, bahan-bahan tersebut boleh disimpan, kecuali ditentukan lain, hingga maksimal 24 jam di dalam lemari pendingin.

CATATAN Dalam kasus tertentu, jika terdapat potensi partikel yang membingungkan dari produk dengan koloni yang dihitung, akan bermanfaat untuk menyiapkan cawan duplikat yang berisi pengenceran sampel dan media agar yang sama yang disimpan dalam lemari pendingin untuk dibandingkan dengan cawan yang diinkubasi.

9.4 Pengayaan

9.4.1 Umum

Suspensi awal dibuat (lihat 9.2) dalam media pengayaan (5.4.3.2) yang dipilih mengikuti prosedur yang dikembangkan selama uji kesesuaian (lihat pasal 13).

9.4.2 Inkubasi sampel

9.4.2.1 Umum

Inkubasi suspensi awal yang dibuat dalam media pengayaan (5.4.3.2) pada suhu $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama minimal 20 jam.

9.4.2.2 Subkultur

Dengan menggunakan pipet steril, pindahkan 0,1 ml hingga 0,5 ml suspensi yang diinkubasi pada permukaan cawan petri (diameter 85 mm hingga 100 mm) yang berisi sekitar 15 ml hingga 20 ml media agar deteksi yang sesuai (5.4.2.1). Jika cawan petri yang lebih besar digunakan, volume agar juga ditingkatkan.

9.4.2.3 Inkubasi subkultur

Jangan membalik cawan yang diinokulasi (atau menunggu penyerapan suspensi oleh agar sebelum membalik) dan inkubasi pada suhu $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam hingga 72 jam.

10 Penghitungan koloni (metode penghitungan cawan dan filtrasi membran)

Setelah inkubasi, hitung jumlah koloni

- dalam cawan petri yang berisi 30 hingga 300 koloni; jika dihitung kurang dari 30 koloni, lihat 12.2.3;
- pada membran yang berisi 15 koloni hingga 150 koloni; jika dihitung kurang dari 15 koloni, lihat 12.2.3.

11 Deteksi pertumbuhan (metode pengayaan)

Setelah inkubasi subkultur, amati permukaan agar dan catat ada atau tidak adanya pertumbuhan.

12 Pernyataan hasil

12.1 Metode perhitungan untuk penghitungan cawan

Hitung jumlah N mikroorganisme yang terdapat dalam sampel S , menggunakan

- m , rata-rata aritmatika dari jumlah yang diperoleh dari duplo pada Rumus (1),
- c , jumlah koloni dihitung pada satu cawan pada Rumus (2), atau
- $\bar{x}c$, rata-rata tertimbang dari jumlah yang diperoleh dari dua pengenceran berturut-turut pada Rumus (3).

sesuai dengan rumus berikut:

$$N = m/(V \cdot d) \tag{1}$$

$$N = c/(V \cdot d) \tag{2}$$

$$N = \bar{x}c/(V \cdot d) \tag{3}$$

dengan

- m adalah rata-rata aritmatika dari jumlah yang diperoleh dari duplo;
- V adalah volume inokulum yang diberikan pada setiap cawan, dalam mililiter;
- d adalah faktor pengenceran yang sesuai dengan pengenceran yang dibuat untuk persiapan suspensi awal (lihat 9.2) atau untuk pengenceran yang dihitung pertama kali;
- c adalah jumlah koloni yang dihitung dalam satu cawan;
- $\bar{x}c$ adalah rata-rata tertimbang dari koloni yang dihitung dari dua pengenceran berturut-turut dan dihitung sebagai berikut:

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

dengan

- $\sum c$ adalah jumlah koloni yang dihitung pada semua cawan yang memenuhi syarat dari dua pengenceran berturut-turut;
- n_1 adalah jumlah cawan yang dihitung pada suspensi awal (atau pada pengenceran yang dihitung pertama);
- n_2 adalah jumlah cawan yang dihitung untuk 1/10 pengenceran suspensi awal (atau untuk pengenceran yang dihitung kedua).

Bulatkan hasil penghitungan menjadi dua angka penting. Untuk ini, jika angka terakhir di bawah 5, angka sebelumnya tidak diubah; jika angka terakhir adalah 5 atau lebih, angka sebelumnya ditambahkan satu unit. Lakukan secara bertahap hingga diperoleh dua angka penting. Catat jumlah N yang diperoleh.

12.2 Interpretasi

12.2.1 Variabilitas yang melekat pada penghitungan cawan sebaiknya diperhitungkan. Dua hasil sebaiknya hanya dipertimbangkan berbeda jika perbedaan melebihi 50%, atau jika dinyatakan dalam logaritmik, perbedaan melebihi 0,3 log.

Untuk menghitung secara tepat, hanya cawan dengan jumlah lebih dari 30 koloni dan kurang dari 300 koloni dan membran dengan jumlah lebih dari 15 koloni dan kurang dari 150 koloni sebaiknya diperhitungkan. Periksa apakah penghitungan diperoleh dari pengenceran yang terbukti sesuai untuk metode yang dipilih (lihat Pasal 13).

12.2.2 Jika jumlah koloni (CFU) lebih dari 30 dan kurang dari 300 pada cawan atau lebih dari 15 dan kurang dari 150 pada membran, dengan S adalah berat atau volume sampel (lihat 9.2), nyatakan hasil sebagai berikut:

— jika S sedikitnya 1 g atau 1 ml, dan V sedikitnya 1 ml;

jumlah bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel = N/S ;

— jika S kurang dari 1 g atau 1 ml, dan/atau V kurang dari 1 ml;

jumlah bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram dalam sampel (catat kuantitas sampel yang diuji, mempertimbangkan S dan V) adalah = N .

Nyatakan hasil sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan faktor 10 (lihat CONTOH 1 sampai 3 dan CONTOH 7 pada 12.3.1, 12.3.2, dan 12.3.7).

12.2.3 Jika jumlah koloni (CFU) kurang dari 30 pada cawan atau 15 pada membran, nyatakan hasil sebagai berikut:

— jika S sedikitnya 1 g atau 1 ml, dan V sedikitnya 1 ml;

perkiraan jumlah bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel = N/S ;

— jika S kurang dari 1 g atau 1 ml, dan/atau V kurang dari 1 ml;

perkiraan jumlah bakteri mesofili aerob dalam sampel = N

dengan S adalah berat atau volume sampel (lihat 9.2).

Nyatakan hasil sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan faktor 10 (lihat CONTOH 4 sampai 6 dan CONTOH 7 pada 12.3.4, 12.3.5, dan 12.3.6).

12.2.4 Jika tidak ada koloni yang teramati, hasil dilaporkan sebagai berikut:

— jika kurang dari $1/d \cdot V \cdot S$ bakteri mesofili aerob per gram atau mililiter produk (S setidaknya 1 g atau 1 ml);

— jika kurang dari $1/d \cdot V$ bakteri mesofili aerob per gram atau mililiter dalam sampel S (catat kuantitas sampel yang diuji, mempertimbangkan S dan V) (S kurang dari 1 g atau 1 ml)

dengan d adalah faktor pengenceran dari suspensi awal (lihat 9.2) dan V adalah 1 (untuk menghitung dengan metode cawan tuang dan untuk filtrasi membran) atau 0,1 (untuk metode cawan sebar) (lihat CONTOH 8 pada 12.3.8).

12.3 Contoh

12.3.1 CONTOH 1 Dua cawan untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-1} , 38 dan 42.

Untuk Rumus (1):

$N = m/(V \cdot d) = 40/(1 \cdot 10^{-1}) = 40/0,1 = 400$ atau $4 \cdot 10^2$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.2 CONTOH 2 Satu cawan untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-1} , 60.

Untuk Rumus (2):

$N = c/(V \cdot d) = 60/(1 \cdot 10^{-1}) = 60/0,1 = 600$ or $6 \cdot 10^2$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.3 CONTOH 3 Dua cawan untuk dua pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-2} , 235 dan 282; untuk pengenceran 10^{-3} , 31 dan 39.

Untuk Rumus (3):

$N = \bar{x}c/(V \cdot d) = 235 + 282 + 31 + 39/1 (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2} = 587/0,022 = 26\ 682$.

Hasil pembulatan seperti yang ditentukan di atas adalah 27 000 atau $2,7 \times 10^4$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.4 CONTOH 4 Dua membran filter untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-1} , 18 dan 22.

Untuk Rumus (1):

$N = m/(V \cdot d) = 20/(1 \cdot 10^{-1}) = 20/0,1 = 200$ atau $2 \cdot 10^2$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.5 CONTOH 5 Satu membran filter untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-1} , 65.

Untuk Rumus (2):

$N = c/(V \cdot d) = 65/1 \cdot 10^{-1}) = 65/0,1 = 650$ or $6 \cdot 10^2$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.6 CONTOH 6 Dua membran filter untuk dua pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-1} , 121 dan 105; untuk pengenceran 10^{-2} , 15 dan 25.

Untuk Rumus (3):

$$N = \bar{x}c/(V \cdot d) = 121 + 105 + 15 + 25/1 (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-1} = 266/0,22 = 1\ 209.$$

Hasil pembulatan seperti yang ditentukan di atas adalah 1 200 atau $1,2 \cdot 10^3$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.7 CONTOH 7 Dua cawan untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; perhitungan yang diperoleh untuk pengenceran 10^{-1} , 28 dan 22.

Untuk Rumus (1):

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

Angka perkiraan adalah 250 atau $2,5 \cdot 10^2$ bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.8 CONTOH 8

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; angka yang diperoleh dari pengenceran 10^{-1} , 0 dan 0.

Untuk Rumus (1):

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

Angka perkiraan kurang dari 10 bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.3.9 CONTOH 9

$S = 1$ g atau 1 ml; $V = 1$; angka yang diperoleh dari pengenceran 10^{-1} , 0 dan 3.

Untuk Rumus (1):

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

Angka perkiraan kurang dari 15 bakteri mesofili aerob per mililiter atau per gram sampel.

12.4 Deteksi setelah pengayaan

Jika pertumbuhan (lihat Pasal 11), nyatakan hasil sebagai:

“Ada bakteri mesofili aerob di dalam sampel S ”

dan lanjutkan perhitungan menggunakan salah satu metode yang diusulkan (lihat 9.3).

Jika tidak ada pertumbuhan (lihat Pasal 11), nyatakan hasil sebagai:

“Tidak ada bakteri mesofili aerob di dalam sampel S ”.

13 Netralisasi sifat antimikroba pada produk

13.1 Umum

Berbagai pengujian yang dijelaskan di bawah ini menunjukkan bahwa mikroorganisme dapat tumbuh pada kondisi analisis.

Dua *strain* (lihat Pasal 7) yang digunakan untuk menunjukkan validitas bahan tersebut umumnya sensitif terhadap bahan antimikroba.

13.2 Penyiapan inokulum

Sebelum pengujian, dan untuk setiap *strain*, inokulasikan ke permukaan media *soybean casein digest agar* (SCDA) atau media lainnya yang sesuai (non-selektif, non-penetralkan). Inkubasikan $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ selama 18 jam sampai 24 jam. Untuk memanen kultur mikroba, gunakan ose (*loop*) steril, gores permukaan kultur dan disuspensikan kembali dalam pengencer suspensi bakteri (lihat 5.3) untuk memperoleh suspensi yang terkalibrasi sekitar 1×10^8 CFU/ml (misalnya menggunakan spektrofotometer; lihat ISO 21148:2017, Lampiran C). Gunakan suspensi ini dan pengencerannya dalam waktu 2 jam.

13.3 Kesesuaian metode penghitungan

13.3.1 Prinsip

Untuk setiap *strain*, campurkan sampel yang telah dinetralkan (suspensi awal atau pengenceran sampel sesuai aktivitas antimikroba atau kelarutan yang rendah dari produk) dengan pengenceran mikroorganisme. Letakkan pada cawan petri atau saring dengan membran. Setelah inkubasi, periksa sifat koloni dan bandingkan penghitungan dengan kontrol (tanpa sampel).

Jika penghitungan kurang dari 50% (0,3 log) dari kontrol, modifikasi prosedur (pengencer, bahan penetral, atau kombinasi keduanya; lihat Lampiran D). Variabilitas yang melekat dari penghitungan cawan sebaiknya dipertimbangkan. Dua hasil sebaiknya hanya dipertimbangkan berbeda jika perbedaan melebihi 50%, atau jika dinyatakan dalam log, perbedaan melebihi 0,3. Kegagalan inokulum untuk tumbuh membuat pengujian tidak valid kecuali ada kemungkinan kontaminasi produk dengan mikroorganisme yang tidak dapat dipercaya.

13.3.2 Uji kesesuaian metode cawan tuang

Campurkan 9 ml suspensi awal dan/atau pengenceran sampel dalam pengencer penetral (atau yang lain; lihat 5.2) dengan 1 ml suspensi mikroorganisme yang mengandung 1000 CFU/ml sampai 3000 CFU/ml. Pindahkan 1 ml ke dalam cawan petri (lebih baik dibuat duplo) dan tuang 15 ml sampai 20 ml media agar yang sudah cair (5.4.2) yang disimpan di penangas air dengan suhu tidak lebih dari 48 °C . Secara paralel, siapkan cawan kontrol menggunakan larutan pengencer yang sama dan pengenceran mikroorganisme yang sama, namun tanpa sampel.

Setelah inkubasi selama 24 jam sampai 72 jam pada $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$, hitung koloni dalam cawan dan bandingkan perhitungan yang diperoleh untuk pengujian dan kontrol. Metode pengenceran dan penghitungan dinilai memenuhi pada pengenceran 1:10 (jika menggunakan suspensi awal 1 ml) jika perhitungan uji kesesuaian kurang dari 50% dibandingkan kontrol.

13.3.3 Kesesuaian metode cawan sebar

Campur 9 ml suspensi awal dengan larutan penetral (atau lainnya; lihat 5.1) dengan 1 ml suspensi mikroorganisme yang mengandung 10 000 CFU/ml sampai 30 000 CFU/ml (atau

kurang jika 0,5 atau 1 ml yang disebarakan). Sebarkan setidaknya 0,1 ml pada cawan media yang telah padat (5.4.2) (lebih baik dibuat duplo). Secara paralel, siapkan cawan kontrol menggunakan pengencer yang sama dan suspensi mikroorganisme yang sama, tapi tanpa sampel.

Setelah inkubasi selama 24 jam sampai 72 jam pada $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, hitung koloni pada cawan dan bandingkan hasil penghitungan untuk sampel uji dan untuk kontrol. Pelarut dan metode penghitungan dinilai memenuhi pada pengenceran 1:10 (jika 1 ml suspensi awal digunakan), jika penghitungan uji kesesuaian setidaknya 50% dibandingkan kontrol.

13.3.4 Kesesuaian metode filtrasi membran

Campur volume suspensi awal atau dari pengenceran sampel yang digunakan untuk pengujian (lihat 9.3.2.3) sejumlah yang sesuai dengan suspensi mikroorganisme yang terstandar setara dengan 100 CFU.

Segera saring seluruh volume dan bilas membran dengan menggunakan sejumlah air (lihat 5.1), pengencer (5.2.3) atau pengencer dengan penetral (5.2.2). Pindahkan membran ke permukaan media agar yang sesuai (5.4.2).

Secara paralel, siapkan kontrol dengan kondisi yang sama seperti di atas, namun tanpa produk. Saring dan bilas kontrol dengan kondisi yang sama.

Setelah inkubasi selama 24 jam sampai 72 jam pada $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, hitung koloni pada membran dan bandingkan hasil penghitungan untuk sampel uji dan untuk kontrol. Metode filtrasi membran dan pengencer dinilai memenuhi jika penghitungan setidaknya 50% dibandingkan kontrol.

13.4 Kesesuaian metode deteksi dengan pengayaan

13.4.1 Prosedur

Siapkan tabung yang mengandung 9 ml larutan untuk suspensi bakteri (lihat 5.3) pengenceran setiap *strain* suspensi yang dikalibrasi untuk memperoleh perhitungan akhir antara 100 CFU/ml dan 500 CFU/ml. Untuk menghitung konsentrasi akhir mikroorganisme hidup dalam suspensi terstandarisasi, pindahkan 1 ml suspensi ke cawan petri dan tuang 15 ml sampai 20 ml media agar yang sudah cair (5.4.2) yang disimpan dalam penangas air tidak lebih dari $48\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inkubasi pada $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 20 jam sampai 24 jam.

Siapkan duplo suspensi awal sampel (3.3) pada kondisi yang dipilih untuk pengujian (setidaknya 1 g atau 1 ml produk, volume media pengayaan yang ditentukan (5.4.3.2) pada tabung atau labu). Pada satu tabung (uji kesesuaian), masukkan secara aseptik 0,1 ml suspensi mikroorganisme yang sudah terstandarisasi. Campur, lalu inkubasi tiap tabung (uji kesesuaian dan kontrol) pada $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 20 jam sampai 24 jam.

Untuk setiap tabung atau labu dan menggunakan pipet steril, pindahkan 0,1 ml sampai 0,5 ml (kondisi sama saat pengujian) dari campuran yang sudah diinkubasi ke permukaan cawan petri (diameter 85 mm sampai 100 mm) mengandung sekitar 15 ml sampai 20 ml media agar yang sesuai.

Inkubasi pada $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam sampai 72 jam.

13.4.2 Interpretasi hasil

Untuk setiap *strain*, periksa suspensi bakteri yang sudah terstandarisasi mengandung antara 100 CFU/ml dan 500 CFU/ml.

Metode netralisasi dan deteksi dinilai memenuhi jika karakteristik pertumbuhan, dijelaskan sebagai berikut,

- untuk *Staphylococcus aureus*: kultur terpigmentasi kuning, dan
- untuk *Pseudomonas aeruginosa*: kultur kehijauan hingga kekuningan dari organisme yang diinokulasi,

muncul pada cawan uji kesesuaian dan tidak ada pertumbuhan yang muncul pada cawan kontrol.

Jika terdeteksi pertumbuhan pada cawan kontrol (produk terkontaminasi), metode netralisasi dan deteksi dinilai memenuhi jika mikroorganisme yang diinokulasikan diperoleh kembali pada cawan uji kesesuaian.

13.5 Interpretasi hasil uji kesesuaian

Kegagalan pertumbuhan pada cawan uji kesesuaian menunjukkan aktivitas antimikroba masih ditemukan dan diperlukan modifikasi kondisi dan metode. Ini dapat diatasi dengan meningkatkan volume media nutrisi, kuantitas produk tetap sama, atau dengan penggabungan kuantitas yang mencukupi dari bahan inaktivasi pada media nutrisi, atau dengan kombinasi modifikasi yang sesuai sehingga memungkinkan pertumbuhan bakteri.

Jika, meskipun sudah menggunakan bahan inaktivasi yang sesuai dan peningkatan volume media yang signifikan, masih tidak memungkinkan untuk memulihkan kultur yang hidup seperti dijelaskan di atas, mengindikasikan bahwa produk tidak mungkin terkontaminasi dengan spesies mikroorganisme yang diberikan.

14 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji harus mencakup hal berikut ini:

- a) semua informasi yang diperlukan untuk identifikasi produk yang lengkap;
- b) metode yang digunakan;
- c) hasil yang diperoleh;
- d) semua prosedur yang merinci penyiapan suspensi awal;
- e) deskripsi metode dengan penetral dan media yang digunakan;
- f) kesesuaian metode, bahkan jika pengujian dilakukan terpisah;
- g) poin apapun yang tidak ditentukan dalam standar ini, atau dianggap sebagai opsional, bersama dengan kejadian apapun yang memengaruhi hasil.

Lampiran A
(informatif)
Pengencer netralisasi lainnya

A.1 Umum

Pengencer netralisasi apapun dapat digunakan untuk menyiapkan suspensi awal jika telah diperiksa dan terbukti sesuai. Pengencer netralisasi berikut adalah contoh formula yang sesuai. Informasi umum untuk penetral diberikan pada Lampiran D.

A.2 Larutan Eugon LT100 *broth* cair

Lihat 5.4.3.2.

A.3 Pengencer lesitina polisorbate (LP)**A.3.1 Komposisi**

Polipepton	1,0 g
Lesitina telur	0,7 g
Polisorbat 80	20,0 g
Air	980 ml

A.3.2 Penyiapan

Campur dan larutkan bahan-bahan dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Dinginkan hingga suhu 25°C sebelum membagi larutan ke wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,2 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

A.4 *Modified Lethen broth* ^[11]**A.4.1 Komposisi**

<i>Peptic digest of meat</i>	20,0 g
<i>Pancreatic digest of casein</i>	5,0 g
<i>Beef extract</i>	5,0 g
<i>Yeast extract</i>	2,0 g
Lesitina	0,7 g
Polisorbat 80	5,0 g
Natrium klorida	5,0 g
Natrium bisulfit	0,1 g
Air	1 000 ml

A.4.2 Penyiapan

Larutkan polisorbat 80 dan lesitina berturut-turut ke dalam air mendidih hingga larut sempurna. Larutkan komponen lain dengan cara mencampur sambil dipanaskan. Campur dengan perlahan untuk menghindari busa. Bagi media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,2 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

Lampiran B
(informatif)
Pengencer lainnya

B.1 Umum

Pengencer apapun dapat digunakan untuk menyiapkan suspensi awal jika telah diperiksa dan terbukti sesuai. Pengencer berikut adalah contoh formula yang sesuai.

B.2 *Buffered pepton solution* pH 7

B.2.1 Komposisi

<i>Meat pepton</i>	1,0 g
Natrium klorida	4,3 g
Monokalium fosfat	3,6 g
Dinatrium fosfat dihidrat	7,2 g
Air	1 000 ml

B.2.2 Penyiapan

Larutkan bahan-bahan dalam air mendidih. Campur. Dinginkan hingga suhu 25°C sebelum menuang larutan ke wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan $7,1 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

Lampiran C (informatif) Media kultur lainnya

C.1 Umum

Media kultur apapun dapat digunakan untuk menyiapkan suspensi awal jika telah diperiksa dan terbukti sesuai. Media berikut adalah contoh formula yang sesuai.

C.2 Media agar untuk penghitungan

C.2.1 Media agar Eugon LT 100

Lihat 5.4.3.3.1.

C.2.2 Agar LT 100

C.2.2.1 Komposisi

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15,0 g
<i>Papaic digest of soybean meal</i>	5,0 g
Natrium klorida	5,0 g
Lesitina telur	1,0 g
Polisorbat 80	5,0 g
<i>Octoxynol 9</i>	1,0 g
Agar	15,0 g
Air	1 000 ml

C.2.2.2 Penyiapan

Larutkan polisorbat 80, *octoxynol 9* dan lesitina telur berturut-turut ke dalam air mendidih sampai larut sempurna. Larutkan bahan lain dengan mencampur sambil dipanaskan. Campur dengan perlahan untuk menghindari busa. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

C.2.3 Media *soybean casein digest* yang ditambahkan agar (SCD *broth* yang ditambahkan agar)

C.2.3.1 Komposisi

<i>Casein peptone</i>	17,0 g
<i>Soybean peptone</i>	3,0 g
Natrium klorida	5,0 g
Dikalium hidrogen fosfat	2,5 g

Glukosa	2,5 g
Agar	15,0 g
Air	1 000 ml

C.2.3.2 Penyiapan

Larutkan semua bahan atau media lengkap dehidrat berturut-turut ke dalam air mendidih sampai larut sempurna. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan $7,2 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

C.3 Media pengayaan

C.3.1 *Modified Lethen broth* ^[11]

Lihat A.4.

C.3.2 Media *Soybean-casein-digest-lecithin-polysorbate 80* (SCDLP 80 broth)

C.3.2.1 Komposisi

<i>Casein peptone</i>	17,0 g
<i>Soybean peptone</i>	3,0 g
Natrium klorida	5,0 g
Dikalium hidrogen fosfat	2,5 g
Glukosa	2,5 g
Lesitina	1,0 g
Polisorbat 80	7,0 g
Air	1 000 ml

C.3.2.2 Penyiapan

Larutkan semua bahan atau media lengkap dehidrat berturut-turut ke dalam air mendidih sampai larut sempurna. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan $7,2 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

C.3.3 Media penetral D/E (media penetral Dey/Engley) ^[11]

C.3.3.1 Komposisi

Glukosa	10,0 g
<i>Soybean lecithin</i>	7,0 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6,0 g
Polisorbat 80	5,0 g
<i>Pancreatic digest of casein</i>	5,0 g

NaHSO ₃	2,5 g
<i>Yeast extract</i>	2,5 g
Natrium tioglikolat	1,0 g
<i>Bromocresol purple</i>	0,02 g
Air	1 000 ml

C.3.3.2 Penyiapan

Larutkan semua bahan atau media lengkap dehidrat berturut-turut ke dalam air mendidih sampai larut sempurna. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan $7,2 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

C.4 Media agar *Soybean-casein-digest-lecithin-polysorbate 80* (SCDLPA) untuk deteksi

C.4.1 Komposisi

<i>Casein peptone</i>	15,0 g
<i>Soybean peptone</i>	5,0 g
Natrium klorida	5,0 g
Lesitina telur	1,0 g
Polisorbat 80	7,0 g
Agar	15,0 g
Air	1 000 ml

C.4.2 Penyiapan

Campur semua bahan dan larutkan dengan pemanasan. Tuang media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan $7,0 \pm 0,2$ ketika diukur di suhu ruang.

Lampiran D
(informatif)
Penetrasi aktivitas antimikroba pengawet dan cairan pembilas

Tabel D.1

Pengawet	Bahan kimia yang dapat menetralkan aktivitas antimikroba pengawet	Contoh penetrasi yang sesuai dan cairan pembilas ^{[6][12]} (untuk metode filtrasi membran)
Senyawa fenolik: paraben, <i>phenoxyethanol</i> , <i>phenylethanol</i> , etc. <i>Anilides</i>	Lesitina Polisorbat 80 Kondensat etilena oksida dari <i>fatty alcohol</i> Surfaktan non-ionik	Polisorbat 80, 30 g/l + lesitina, 3 g/l. Kondensat etilena oksida dari <i>fatty alcohol</i> , 7 g/l + lesitina, 20 g/l + Polisorbat 80, 4 g/l. Media penetrasi D/E ^a . <i>Cairan pembilas: air suling; tryptone, 1 g/l + NaCl 9 g/l; Polisorbat 80, 5 g/l.</i>
Senyawa amonium kuarternar Surfaktan kationik	Lesitina, saponin, polisorbat 80, natrium dodesil sulfat Kondensat etilena oksida dari <i>fatty alcohol</i>	Polisorbat 80, 30 g/l + natrium dodesil sulfat, 4 g/l + lesitina, 3 g/l. Polisorbat 80, 30 g/l + saponin, 30 g/l + lesitina, 3 g/l. Media penetrasi D/E ^a . <i>Cairan pembilas: air suling; tryptone, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; Polisorbat 80, 5 g/l.</i>
Aldehidada <i>Formaldehyde-release agents</i>	Glisina, histidina	Lesitina, 3 g/l + Polisorbat 80, 30 g/l + <i>L-histidine</i> , 1 g/l. Polisorbat 80, 30 g/l + saponin, 30 g/l + <i>L-histidine</i> , 1 g/l + <i>L-cysteine</i> , 1 g/l. Media penetrasi D/E ^a . <i>Cairan pembilas: Polisorbat 80, 3 g/l + L-histidine 0,5 g/l.</i>
Senyawa pengoksidasi	Natrium tiosulfat	Natrium tiosulfat, 5 g/l. <i>Cairan pembilas: natrium tiosulfat, 3 g/l.</i>
<i>Isothiazolinones</i> , <i>imidazoles</i>	Lesitina, saponin Amina, sulfat, <i>mercaptans</i> , natrium bisulfat, natrium tioglikolat	Polisorbat 80, 30 g/l + saponin, 30 g/l + lesitina, 3 g/l. <i>Cairan pembilas: tryptone, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; Polisorbat 80, 5 g/l.</i>
Biguanid	Lesitina, saponin, polisorbat 80	Polisorbat 80, 30 g/l + saponin, 30 g/l + lesitina, 3 g/l. <i>Cairan pembilas: tryptone, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; Polisorbat 80, 5 g/l.</i>
Garam logam (Cu, Zn, Hg) Senyawa organo-merkuri	Natrium bisulfat, <i>L-cysteine</i> Senyawa sulfhidril, asam tioglikolat	Natrium tioglikolat, 0,5 g/l or 5 g/l. <i>L-cysteine</i> , 0,8 g/l or 1,5 g/l. Media penetrasi D/E ^a . <i>Cairan pembilas: natrium thioglycollate, 0,5 g/l.</i>
^a Media penetrasi D/E (Media penetrasi Dey/Engley); Lihat Lampiran C.		

Bibliografi

- [1] ISO 18415, Cosmetics — Microbiology — Detection of specified and non-specified microorganisms
- [2] ISO 18416, Cosmetics — Microbiology — Detection of *Candida albicans*
- [3] ISO 21150, Cosmetics — Microbiology — Detection of *Escherichia coli*
- [4] ISO 22717, Cosmetics — Microbiology — Detection of *Pseudomonas aeruginosa*
- [5] ISO 22718, Cosmetics — Microbiology — Detection of *Staphylococcus aureus*
- [6] EN 1040, 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)
- [7] CTFA. Microbiology Guidelines, 2001 published by the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association ISBN 1-882621-32-8
- [8] EP, Microbiological Examination of non-sterile products, 4th edition, 2002 published by the European Pharmacopoeia
- [9] J.P 14, General tests — Microbial limit test, 2001 published by the Japanese Pharmacopoeia
- [10] USP 28, Microbial limit test , 2005 published by the U.S. Pharmacopoeia
- [11] FDA. Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, 1995 published by the U.S. Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>
- [12] Singer S. The use of preservative neutralizers in diluents and plating media. *Cosmetics and Toiletries*. 1987, 102 (December) p. 55
- [13] COLIPA, Guidelines on Microbial Quality Management, 1997 published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA)
- [14] Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993
- [15] ISO 29621, Cosmetics — Microbiology — Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products

Informasi perumus SNI ISO 21149:2017

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 71-07 Kosmetik

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua	:	Hayun
Wakil Ketua	:	Sri Purwaningsih
Sekretaris	:	Yuniar Intan Hartono
Anggota	:	1. Noviana Kus Yuniati
		2. Irma Rumondang Lamria
		3. Dwi Lulu Agus Mulyana
		4. Toto Waluyadi
		5. Suwidji Wongso
		6. Huzna Zahir
		7. Liandhajani
		8. Ervani Setya Susanti
		9. Istinganatun Khoeriyah

[3] Konseptor Rancangan SNI

Sri Surati

Kemala S. Nagur

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

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