

Mikrobiologi rantai pangan — Metode horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulase-positif (*Staphylococcus aureus* dan spesies lain) — Bagian 2: Metode menggunakan medium rabbit plasma fibrinogen agar

Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium

(ISO 6888-2:2021 dan ISO 6888-2:2021/Amd.1:2023, IDT)

Pengguna dari RSNI ini diminta untuk menginformasikan adanya hak paten dalam dokumen ini, bila diketahui, serta memberikan informasi pendukung lainnya (pemilik paten, bagian yang terkena paten, alamat pemberi paten dan lain-lain).

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
Pendahuluan	iv
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif	2
3 Istilah dan definisi	2
4 Prinsip	2
5 Media biakan dan pereaksi	3
6 Peralatan dan bahan habis pakai	3
7 Pengambilan contoh	4
8 Penyiapan contoh uji	4
9 Prosedur (lihat Gambar A.1)	4
10 Pernyataan hasil	6
11 Karakteristik kinerja metode	6
12 Laporan hasil uji	8
13 Jaminan mutu	8
Lampiran A (normatif) Diagram alir prosedur	9
Lampiran B (normatif) Media biakan dan pereaksi	10
Lampiran C (informatif) Hasil dari studi antar-laboratorium	14
Bibliografi	31
Gambar A.1 — Diagram alir prosedur untuk enumerasi <i>staphylococci</i> koagulase-positif (<i>Staphylococcus aureus</i> dan spesies lain) menggunakan medium RPFA	9

Prakata

SNI ISO 6888-2:2021 dengan judul *Mikrobiologi rantai pangan – Metode horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulase-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 2: Metode menggunakan medium rabbit plasma fibrinogen agar* merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi identik dari standar ISO 6888-2:2021, *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium* dengan menambahkan ISO 6888-2:2021/Amd 1:2023 *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium – Amendment 1*, dengan metode terjemahan dua bahasa yang ditetapkan oleh BSN pada tahun 20XX.

SNI ini merevisi SNI ISO 6888-2:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulase-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 2: Teknik menggunakan media rabbit plasma fibrinogen agar (ISO 6888-2:1999; ISO 6888-2:1999/Amd1:2003, IDT)*, untuk tujuan harmonisasi dengan standar internasional yang berlaku. Perubahan yang ada pada SNI ISO 6888-2:2021 meliputi:

- judul telah disesuaikan berkaitan dengan "Rantai pangan";
- status Standar ini dan ISO 6888-1 telah diperjelas;
- Standar ini telah disesuaikan dengan ISO 7218:2007, yaitu menuangkan media agar cair pada suhu 44 °C hingga 47 °C;
- semua perlakuan, apabila sesuai, telah diubah dari "35 °C atau 37 °C" menjadi "34 °C hingga 38 °C";
- semua perlakuan waktu inkubasi, apabila sesuai, telah diubah dari "18 jam hingga 24 jam" menjadi "24 jam ± 2 jam";
- persyaratan telah ditambahkan untuk menggunakan ISO 11133;
- semua standar yang tersedia terkait teknik pengambilan contoh telah diperbarui;
- prosedur diagram alir di Lampiran A telah diperbarui;
- media kultur dan pereaksi dengan uji kinerja telah ditambahkan dan dipindahkan ke Lampiran B;
- uji kinerja untuk medium *rabbit plasma fibrinogen agar* (RPFA) telah ditambahkan;
- hasil studi antar laboratorium (dari ISO 6888-2:1999/Amendment 1:2003 presisi data) telah diperbarui;
- daftar pustaka telah diperbarui.

Terdapat standar ISO yang dijadikan sebagai acuan normatif dalam standar ini telah diadopsi menjadi Standar Nasional Indonesia (SNI), yaitu:

- ISO 6887 (semua bagian), *Mikrobiologi rantai pangan - Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi*
- ISO 7218, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Persyaratan umum dan pedoman untuk pengujian mikrobiologi*
- ISO 11133, *Mikrobiologi bahan pangan, pakan dan air – Persiapan, produksi, penyimpanan dan pengujian kinerja media biakan*
- ISO 19036:2019, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan - Panduan untuk menetapkan kisaran nilai ketidak pastian pengukuran untuk penghitungan kuantitatif - Pengukuran ketidakpastian untuk penghitungan rendah*

Untuk tujuan penggunaan standar ini, *this International Standard* diterjemahkan menjadi Standar ini. Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini maka disarankan untuk melihat standar aslinya yaitu ISO 6888-2:2021 dan/atau dokumen terkait lain yang menyertainya.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 19-05, Metode Pengujian Mikrobiologi. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 20 Agustus 2024 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal2024 sampai dengan2024 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

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

Pendahuluan

ISO 6888-1, Standar ini, dan ISO 6888-3 menjelaskan tiga metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi *Staphylococci* koagulase-positif, di antaranya terdapat strain enterotoksinogenik. Standar ini berfokus pada *Staphylococcus aureus*, tetapi juga mencakup *S. intermedius* dan beberapa strain *S. hyicus*.

Untuk keperluan Standar ini, karakterisasi *staphylococci* didasarkan pada reaksi koagulase-positif, namun diakui bahwa beberapa strain *Staphylococcus aureus* memberikan reaksi koagulase-positif yang lemah. Strain-strain tersebut dapat membingungkan terhadap adanya bakteri lain, namun mereka dapat dibedakan dengan menggunakan tes tambahan yang tidak termasuk dalam Standar ini, seperti tes sensitivitas terhadap lisostafin, produksi hemolisin, nuklease termostabil, dan produksi asam dari manitol (lihat ISO 7218 dan Referensi [13]).

Perubahan teknis utama yang tercantum dalam Kata Pengantar, yang diperkenalkan dalam Standar ini dibandingkan dengan edisi sebelumnya, dianggap sebagai perubahan kecil (lihat ISO 17468). Perubahan ini memiliki dampak kecil pada karakteristik kinerja metode ini.

Hasil studi antar laboratorium dan contoh yang diuji dijelaskan dalam Lampiran C.

Mikrobiologi rantai pangan — Metode horizontal untuk enumerasi *staphylococci* koagulase-positif (*Staphylococcus aureus* dan spesies lainnya) — Bagian 2: Metode menggunakan medium *rabbit plasma fibrinogen agar*

PERINGATAN - Untuk menjaga kesehatan personel laboratorium, sangat penting bahwa uji untuk mendeteksi *staphylococci* hanya dilakukan di laboratorium yang dilengkapi peralatan yang memadai, di bawah pengawasan ahli mikrobiologi yang terampil, dan perlu dilakukan tindakan hati-hati dalam pembuangan semua bahan yang telah diinkubasi. Personel yang menggunakan Standar ini harus terbiasa dengan praktik laboratorium secara umum. Standar ini tidak ditujukan untuk menangani semua aspek keamanan, jika ada, hanya yang terkait dengan penggunaannya. Hal tersebut merupakan tanggung jawab pengguna untuk menetapkan praktik keamanan dan kesehatan yang tepat.

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode horizontal untuk enumerasi *staphylococci* koagulase-positif dengan menghitung koloni yang diperoleh pada medium padat (medium *rabbit plasma fibrinogen agar*) setelah inkubasi aerobik pada suhu 34 °C hingga 38 °C (lihat Referensi [10]).

Standar ini berlaku untuk:

- produk yang ditujukan untuk konsumsi manusia;
- produk yang ditujukan untuk pakan hewan;
- contoh lingkungan dari area produksi, penanganan pangan dan pakan;
- contoh dari tahap produksi primer.

Metode horizontal ini awalnya dikembangkan untuk pengujian semua contoh yang berada dalam rantai pangan.

Karena beragamnya produk dalam rantai pangan, mungkin metode horizontal ini tidak sesuai untuk setiap detail semua produk. Meskipun demikian, diharapkan modifikasi yang diperlukan dapat diminimalkan sehingga tidak mengakibatkan penyimpangan signifikan dari metode horizontal ini.

Berdasarkan informasi yang tersedia pada saat publikasi Standar ini, metode ini dianggap sangat sesuai (sepenuhnya) untuk uji produk yang difermentasi atau produk lain yang mengandung flora teknologis (*technological flora*) dari *Staphylococcus* spp (misalnya *S. xylosus*) (seperti keju yang dibuat dari susu mentah dan beberapa produk daging mentah) yang mungkin terkontaminasi oleh:

- *staphylococci* yang membentuk koloni tidak khas pada medium *Baird-Parker agar*;
- *background flora* yang dapat menyembunyikan koloni yang dicari.

Meskipun demikian, baik ISO 6888-1 maupun Standar ini diberikan status setara.

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 6887 (*all part*), *Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 19036:2019, *Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan dokumen ini, istilah dan definisi berikut berlaku.

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

— Platform penjelajahan daring ISO: tersedia di <https://www.iso.org/obp>

— Elektropedia IEC: tersedia di <http://www.electropedia.org/>

3.1

***staphylococci* koagulase-positif**

bakteri yang membentuk koloni khas dalam medium biakan selektif (medium *rabbit plasma fibrinogen agar*)

Catatan 1 untuk entri: Koloni khas dijelaskan di 9.3.

3.2

enumerasi *staphylococci* koagulase-positif

penentuan jumlah *staphylococci* koagulase-positif (3.1) per gram, per mililiter, per sentimeter persegi, atau per alat pengambilan contoh (*sampling device*)/area yang diambil contohnya

Catatan 1 untuk entri: Area yang diambil contoh adalah area yang tidak didefinisikan oleh ukuran numerik, misalnya keran air panas, gagang pintu.

4 Prinsip

4.1 Umum

Penyiapan cawan tuang medium *rabbit plasma fibrinogen agar*, dengan jumlah tertentu dari contoh uji jika produknya berupa cairan atau dengan jumlah tertentu dari suspensi awal dalam kasus produk lainnya.

Inokulasi, dalam kondisi yang sama, menggunakan pengenceran desimal dari contoh uji, ikuti prosedur sesuai dengan ISO 7218.

CATATAN Volume medium *rabbit plasma fibrinogen agar* yang akan ditambahkan ke inokulum merupakan titik kritis untuk metode dan reaksi koagulase.

4.2 Inkubasi

Inkubasi cawan secara aerobik pada 34 °C hingga 38 °C dan amati setelah 24 jam dan jika perlu setelah 48 jam.

4.3 Enumerasi

Hitung jumlah *staphylococci* koagulase-positif per gram contoh, per mililiter contoh, per sentimeter persegi, atau per alat pengambilan contoh (*sampling device*) dari jumlah koloni khas yang diperoleh pada cawan di tingkat pengenceran yang dipilih untuk memberikan hasil yang signifikan dalam batas perhitungan dari metode dan sesuai dengan ISO 7218.

CATATAN Lihat Lampiran A untuk diagram alur.

5 Media biakan dan pereaksi

Ikuti praktik laboratorium terkini sesuai dengan ISO 7218.

Komposisi media biakan dan reagen serta penyiapannya dijelaskan dalam Lampiran B.

Untuk uji kinerja media biakan dan pereaksi, ikuti prosedur sesuai dengan Lampiran B atau ISO 11133, atau keduanya.

Untuk pengenceran, lihat bagian yang sesuai dari seri ISO 6887.

6 Peralatan dan bahan habis pakai

Peralatan sekali pakai (*disposable*) dapat digunakan sebagai alternatif jika memiliki spesifikasi yang sesuai dengan peralatan kaca yang dapat dipakai berulang.

Peralatan laboratorium mikrobiologi umum (lihat ISO 7218) dan khusus adalah sebagai berikut:

6.1 Peralatan untuk sterilisasi kering (oven) dan sterilisasi basah (autoklaf).

Lihat ISO 7218.

6.2 Inkubator, mampu menjaga media yang diinokulasi dalam rentang 34 °C hingga 38 °C.

CATATAN Rentang 34 °C hingga 38 °C untuk inkubasi media mencakup penggunaan inkubator yang diatur pada 35 °C ± 1 °C, 36 °C ± 2 °C, atau 37 °C ± 1 °C.

6.3 Penangas air, atau peralatan serupa, dapat dipertahankan pada 44 °C hingga 47 °C.

6.4 Cawan Petri steril, dengan diameter sekitar 90 mm, terbuat dari kaca atau plastik.

6.5 Pipet ukur steril atau pipet otomatis dengan kapasitas nominal 1 ml, 2 ml, dan 10 ml, dengan skala berturut-turut 0,1 ml, 0,1 ml, dan 0,5 ml. Lihat ISO 7218.

Pipet ukur dan tip pipet harus dilengkapi dengan sumbat kapas non-absorben untuk mencegah kontaminasi saat digunakan untuk menangani biakan mikroba.

6.6 pH-meter, dapat dibaca hingga mendekati 0,01 unit pH, memungkinkan pengukuran yang akurat dengan toleransi $\pm 0,1$ unit pH. pH meter harus dilengkapi dengan kompensasi suhu manual atau otomatis. Lihat SNI ISO 7218.

6.7 Refrigerator, mampu beroperasi pada $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.8 Tabung reaksi, botol, atau labu steril dengan penutup, dengan ukuran yang sesuai. Botol atau labu dengan tutup ulir logam atau plastik yang tidak beracun dapat digunakan.

6.9 Membran, dengan ukuran pori 0,2 μm .

7 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh bukan bagian dari metode yang ditetapkan dalam Standar ini. Lihat Standar Internasional spesifik yang berhubungan dengan produk terkait. Jika tidak tersedia Standar Internasional spesifik yang berhubungan dengan pengambilan contoh produk terkait, pihak-pihak yang berkepentingan sebaiknya mencapai kesepakatan mengenai hal ini.

Metode pengambilan contoh yang direkomendasikan terdapat dalam Standar berikut:

- ISO/TS 17728 untuk pangan dan pakan;
- ISO 707 untuk susu dan produk susu;
- ISO 6887-3 untuk ikan dan produk perikanan;
- ISO 13307 untuk tahap produksi primer;
- ISO 17604 untuk karkas;
- ISO 18593 untuk permukaan.

Penting bahwa laboratorium menerima contoh yang representatif. Contoh tidak boleh rusak atau berubah selama pengangkutan atau penyimpanan.

8 Penyiapan contoh uji

Siapkan contoh uji dari contoh laboratorium sesuai dengan Standar Internasional spesifik yang berkaitan dengan produk yang terkait: ikuti prosedur yang dijelaskan dalam seri ISO 6887 dan, jika perlu, ISO 18593. Jika tidak ada Standar Internasional spesifik yang sesuai, disarankan agar para pihak yang berkepentingan mencapai kesepakatan tentang hal ini.

9 Prosedur (lihat Gambar A.1)

9.1 Porsi uji, suspensi awal, dan pengenceran

Lihat bagian yang sesuai dari seri ISO 6887.

9.2 Inokulasi dan inkubasi

Pindahkan, menggunakan pipet ukur steril (6.5), 1 ml contoh uji jika berupa cairan, atau 1 ml suspensi awal (pengenceran 10^{-1}) untuk produk lain, ke cawan Petri (lihat Lampiran B). Untuk teknik enumerasi dalam mikrobiologi rantai pangan, jumlah cawan Petri yang akan digunakan sesuai dengan pengenceran yang diuji, dijelaskan dalam ISO 7218. Ulangi prosedur untuk pengenceran desimal tambahan jika diperlukan.

Tuangkan 18 ml hingga 20 ml medium lengkap yang baru disiapkan (B.2.3) secara langsung ke dalam masing-masing cawan Petri (6.4) untuk mendapatkan ketebalan setidaknya 3 mm.

Campurkan dengan hati-hati inokulum dengan medium biakan dan biarkan memadat dengan meletakkan cawan Petri di permukaan datar.

Setelah memadat sempurna, balikkan cawan dan letakkan di inkubator (6.2) yang diatur pada 34 °C hingga 38 °C. Setelah diinkubasi selama 24 jam \pm 2 jam, tandai posisi bagian bawah cawan untuk setiap koloni khas yang ada. Jika tidak ada koloni atau tidak ada koloni khas yang diperoleh pada 24 jam \pm 2 jam, inkubasi kembali semua cawan pada 34 °C hingga 38 °C dengan tambahan 24 jam \pm 2 jam (total 48 jam \pm 4 jam), dan tandai koloni khas yang ada.

CATATAN Walaupun terdapat inhibitor tripsin dalam medium RPFA, koloni dengan tampilan khas setelah inkubasi 24 jam \pm 2 jam dapat kehilangan tampilan khas setelah inkubasi 48 jam \pm 4 jam, karena proses enzimatik (tripsin) atau karena pertumbuhan yang berlebihan[11]. Penghitungan yang hanya dilakukan pada 48 jam \pm 4 jam dapat menunjukkan jumlah koloni yang rendah atau tidak ada koloni.

9.3 Penghitungan koloni

9.3.1 Deskripsi umum koloni yang tumbuh pada medium RPFA

Koloni khas yaitu koloni berwarna hitam atau abu-abu, atau bahkan putih, kecil, dan dikelilingi lingkaran presipitasi keruh (*halo*), yang menunjukkan aktivitas koagulasi. Koloni *Proteus* dapat terlihat seperti koloni *staphylococci* koagulasi-positif pada awal inkubasi. Namun demikian, koloni *Proteus* dapat dibedakan dari *staphylococci* setelah 24 jam \pm 2 jam dan 48 jam \pm 4 jam inkubasi, koloni *Proteus* menjadi kecokelatan dan mulai menyebar.

9.3.2 Prosedur penghitungan koloni

Pada akhir periode inkubasi (lihat 9.2), hitung koloni khas di setiap cawan.

Saat membaca cawan setelah 24 jam, tandai posisi bagian bawah cawan dari setiap koloni khas yang ada sebelum inkubasi lebih lanjut.

Jika cawan diinkubasi kembali pada 34 °C hingga 38 °C selama 24 jam \pm 2 jam, tandai koloni khas baru yang ada.

Untuk enumerasi, hanya menyimpan cawan yang berisi maksimum 300 koloni, dengan 100 koloni khas.

Salah satu cawan harus mengandung setidaknya 10 koloni.

CATATAN Karena medium *rabbit plasma fibrinogen agar* didasarkan pada reaksi koagulasi, tidak diperlukan konfirmasi untuk aktivitas ini.

Ketika jumlah koloni diduga berada pada atau dekat dengan batas penentuan, penggunaan cawan duplo lebih disukai. Jika cawan duplo digunakan, jumlah minimum koloni sebaiknya 10.

Dalam hal ini, tingkat kontaminasi diduga lebih tinggi dari 5 koloni/ml untuk contoh cair atau lebih tinggi dari 50 koloni/g untuk contoh padat.

10 Pernyataan hasil

Untuk perhitungan hasil, ikuti prosedur yang sesuai dengan ISO 7218. Hitung dan laporkan hasil sebagai jumlah *staphylococci* koagulase-positif dalam koloni (*colony forming unit*) per gram, mililiter, per sentimeter persegi, atau per alat pengambilan contoh.

Pada kejadian/kasus tidak ada koloni mikroorganisme target yang terdeteksi, ikuti ISO 7218 untuk pernyataan hasil untuk kejadian/kasus tertentu.

11 Karakteristik kinerja metode

11.1 Studi antar-laboratorium

Hasil studi antar-laboratorium untuk menentukan presisi metode dirangkum pada Lampiran C. Batas *repeatability* dan *reproducibility* ditentukan menggunakan empat jenis contoh (keju, daging, bubuk telur, dan bahan acuan) yang terkontaminasi pada berbagai tingkat.

Nilai yang diperoleh dari studi antar-laboratorium mungkin tidak berlaku untuk rentang konsentrasi dan jenis contoh selain yang tercantum dalam Lampiran C.

11.2 Batas *repeatability*

Perbedaan absolut antara dua hasil uji tunggal (dikonversi \log_{10}) (jumlah *staphylococci* koagulase-positif per gram atau per mililiter) atau rasio dari tinggi sampai rendah dari dua hasil uji pada skala normal, dengan menggunakan metode yang sama untuk bahan uji yang identik, di laboratorium yang sama oleh operator yang sama, menggunakan peralatan yang sama dalam rentang waktu yang sesingkat mungkin, dan tidak menunjukkan lebih dari 5% kejadian, melebihi batas *repeatability* r .

Sebagai petunjuk umum batas *repeatability* (r), nilai-nilai berikut (median dari nilai per matriks dan tingkat kontaminasi, lihat Lampiran C) dapat digunakan saat menguji contoh pangan secara umum:

— $r = 0,22$, rentang [0,13; 0,33] (dinyatakan sebagai perbedaan absolut antara hasil tes yang diubah menjadi \log_{10}); atau

— $r = 1,70$, rentang [1,35; 2,14] (dinyatakan sebagai rasio dari tinggi sampai rendah dari dua hasil uji pada skala normal).

CONTOH Hasil uji pertama *staphylococci* koagulase-positif per gram dari produk pangan yang diperoleh di laboratorium yang ditentukan adalah 10.000 atau $1,0 \times 10^4$ atau \log_{10} 4,00. Dalam kondisi *repeatability*, perbedaan antara hasil yang dikonversi \log_{10} tidak diharapkan lebih besar dari $\pm 0,22$ unit \log_{10} . Jadi hasil dari uji kedua dari contoh yang sama diharapkan berada antara 3,78 ($4,00 - 0,22$) unit \log_{10} dan 4,22 ($4,00 + 0,22$) unit \log_{10} . Untuk hasil yang tidak dikonversi log, rasio antara hasil uji pertama dan hasil uji kedua dari contoh yang sama tidak diharapkan lebih besar dari 1,70. Jadi hasil uji kedua diharapkan berada antara 5.882 (= $10.000/1,70$) koloni per gram dan 17.000 (= $100.000 \times 1,70$) koloni per gram.

Untuk bahan referensi (kapsul yang mengandung sekitar 5.000 koloni, lihat Lampiran C), nilai-nilai berikut dapat digunakan:

- $r = 0,17$ (dinyatakan sebagai perbedaan mutlak/absolut antara hasil uji yang dikonversi menjadi \log_{10}); atau
- $r = 1,48$ (dinyatakan sebagai rasio dari tinggi sampai rendah dari dua hasil uji pada skala normal).

11.3 Batas *reproducibility*

Perbedaan absolut antara dua hasil uji tunggal (dikonversi \log_{10}) (jumlah *staphylococci* koagulase-positif per gram atau per mililiter) atau rasio dari tinggi sampai rendah dari dua hasil uji pada skala normal, dengan menggunakan metode yang sama untuk bahan uji yang identik, di laboratorium berbeda oleh operator yang berbeda, menggunakan peralatan yang berbeda, akan menunjukkan tidak lebih dari 5% kasus/kejadian, melebihi batas *reproducibility* R .

Sebagai indikasi umum batas *reproducibility* R , nilai-nilai berikut (median dari nilai per matriks dan tingkat kontaminasi, lihat Lampiran C) dapat digunakan saat menguji contoh pangan secara umum:

- $R = 0,33$, rentang [0,27; 0,39] (dinyatakan sebagai perbedaan antara hasil uji yang dikonversi \log_{10}); atau
- $R = 2,20$, rentang [1,86; 2,45] (dinyatakan sebagai rasio dari tinggi sampai rendah dari dua hasil uji pada skala normal).

CONTOH 1 Sebuah hasil uji sebesar 10.000 atau $1,0 \times 10^4$ atau $\log_{10} 4,00$ *staphylococci* koagulase-positif per gram produk pangan di laboratorium pertama. Di bawah kondisi *reproducibility*, perbedaan antara hasil yang dikonversi \log_{10} diharapkan tidak lebih besar dari $\pm 0,33$ unit \log_{10} . Jadi hasil dari laboratorium kedua diharapkan berada antara 3,67 ($4,00 - 0,33$) unit \log_{10} dan 4,33 ($4,00 + 0,33$) unit \log_{10} . Untuk hasil yang tidak dikonversi log, rasio antara hasil uji dari laboratorium pertama dan laboratorium kedua diharapkan tidak lebih besar dari 2,20. Jadi hasil dari laboratorium kedua diharapkan berada antara 4.545 ($= 10.000/2,20$) koloni per gram dan 22.000 ($= 10.000 \times 2,20$) koloni per gram.

CONTOH 2 Sebuah laboratorium ingin mengetahui tingkat maksimum *staphylococci* koagulase-positif yang dapat ditemukan, yang masih sesuai dengan batas yang telah ditetapkan (misalnya, batas 10^5 atau $\log_{10} 5$). Untuk ini, nilai R (pada skala log) dikalikan dengan faktor 0,59¹⁾. Nilai maksimum adalah 0,19 ($0,33 \times 0,59$) sebagai perbedaan antara hasil uji yang dikonversi \log_{10} atau 1,55 ($10^{0,19}$) sebagai rasio antara hasil uji. Jadi, hasil hingga $\log_{10} 5,19$ ($\log_{10} 5 + \log_{10} 0,19$) atau 15.500 ($= 10.000 \times 1,55$) menunjukkan kesesuaian terhadap batas.

Untuk bahan acuan (kapsul yang mengandung sekitar 5.000 koloni, lihat Lampiran C), nilai-nilai berikut dapat digunakan:

- $R = 0,31$ (dinyatakan sebagai perbedaan antara hasil uji yang dikonversi \log_{10}); atau
- $R = 2,04$ (dinyatakan sebagai rasio dari tinggi sampai rendah dari dua hasil uji pada skala normal).

¹⁾ Faktor 0,59 menunjukkan fakta bahwa uji dengan interval satu sisi 95% digunakan untuk menguji apakah batas tersebut terlampaui; ini diperoleh dari rumus berikut: $0,59 = 1,64 / (1,96 \times \sqrt{2})$.

12 Laporan hasil uji

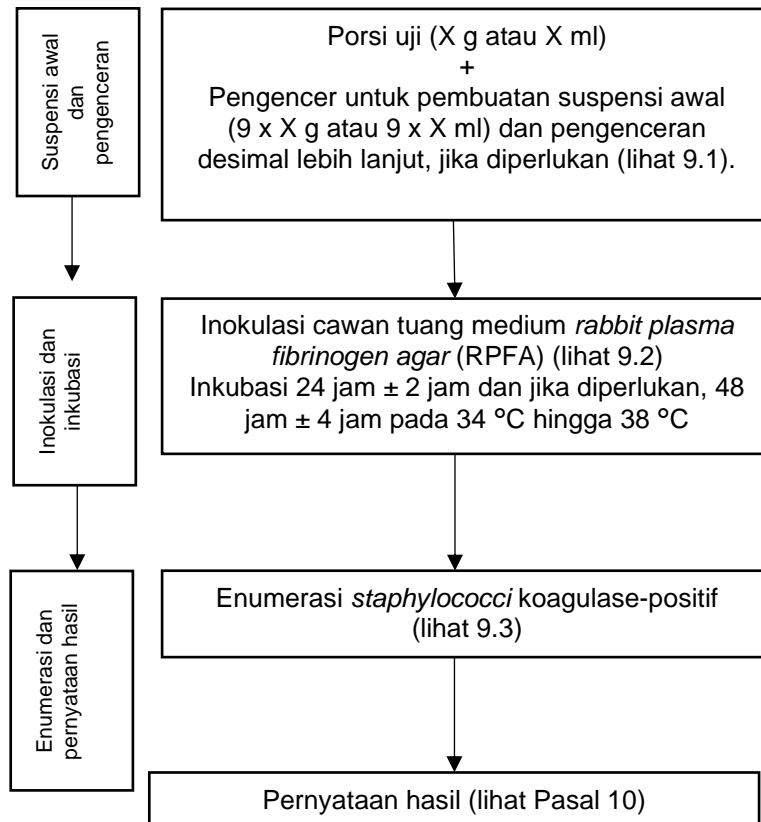
Laporan hasil uji harus mencantumkan setidaknya informasi berikut:

- metode uji yang digunakan, dengan merujuk pada Standar ini, yaitu ISO 6888-2:2021;
- metode pengambilan contoh yang digunakan, jika diketahui;
- semua kondisi operasional yang tidak ditentukan dalam standar ini, atau dianggap opsional, beserta dengan rincian setiap kejadian yang dapat mempengaruhi hasil uji;
- setiap penyimpangan dari standar ini;
- semua informasi yang diperlukan untuk identifikasi contoh secara lengkap;
- hasil uji yang diperoleh setelah 24 jam \pm 2 jam atau setelah 48 jam \pm 4 jam;
- jika diperlukan atau diminta oleh klien, maka perhitungan estimasi ketidakpastian pengukuran dari hasil uji kuantitatif mengacu pada ISO 19036:2019, Pasal 9;
- tanggal uji

13 Jaminan mutu

Laboratorium sebaiknya memiliki sistem pengendalian mutu yang jelas untuk memastikan bahwa peralatan, pereaksi, dan teknik yang digunakan sesuai untuk metode tersebut. Penggunaan kontrol positif, kontrol negatif, dan blanko adalah bagian dari metode tersebut. Uji kinerja media biakan dan pereaksi dijelaskan dalam Lampiran B dan dijelaskan dalam ISO 11133.

Lampiran A
(normatif)
Diagram alir prosedur



Gambar A.1 — Diagram alir prosedur untuk enumerasi *staphylococci* koagulase-positif (*Staphylococcus aureus* dan spesies lain) menggunakan medium RPFA

Lampiran B
(normatif)
Media biakan dan pereaksi

B.1 Umum

Spesifikasi umum pada ISO 11133 berlaku untuk penyiapan dan uji kinerja media biakan yang dijelaskan dalam lampiran ini. Jika media biakan atau pereaksi disiapkan dari media lengkap siap pakai (*dehydrated complete base*) dan pereaksi atau jika media biakan dan pereaksi siap pakai digunakan, ikuti petunjuk pabrikan mengenai penyiapan, kondisi penyimpanan, tanggal kedaluarsa, dan tanggal penggunaan.

Umur simpan media dan bahan kimia yang terdapat dalam lampiran ini telah ditentukan dalam beberapa penelitian. Pengguna harus memverifikasi hal ini di bawah kondisi penyimpanan mereka sendiri (sesuai dengan ISO 11133).

Uji kinerja media biakan dijelaskan dalam B.3.

B.2 Medium RPFA**B.2.1 Medium dasar****B.2.1.1 Komposisi**

<i>Enzymatic digest of casein</i>	10,0 g
<i>Yeast extract</i>	1,0 g
<i>Meat extract</i>	5,0 g
<i>Sodium pyruvate (CAS Number 113-24-6)</i>	10,0 g
<i>Glycine (CAS Number 56-40-6)</i>	12,0 g
<i>Lithium chloride (CAS Number 7447-41-8)</i>	5,0 g
<i>Agar</i>	12 g hingga 22 g ^a
Air, hingga volume akhir sebesar	1.000 ml
^a Tergantung pada kekuatan gel agar.	

B.2.1.2 Penyiapan

Larutkan bahan-bahan atau media lengkap siap pakai (*dehydrated complete base*) ke dalam air dengan cara dididihkan.

Atur pH (6.6) jika diperlukan, sehingga setelah sterilisasi pH menjadi $7,2 \pm 0,2$ pada 25 °C.

Pindahkan 90 ml media ke dalam labu atau botol (6.8) yang sesuai ukurannya.

Sterilkan selama 15 menit dalam autoklaf (6.1) pada 121 °C.

Simpan medium dalam labu tertutup pada 5 °C (6.7) hingga enam bulan.

B.2.2 Larutan untuk medium RPFA**B.2.2.1 Larutan *potassium tellurite*****B.2.2.1.1 Komposisi**

<i>Potassium tellurite</i> ^a (K_2TeO_3) (CAS Number 7790-58-1)	1,0 g
Air	100 ml
^a Sebaiknya dipastikan sebelum digunakan bahwa <i>potassium tellurite</i> yang tersedia sesuai untuk uji ini (lihat B.2.2.1.2).	

B.2.2.1.2 Penyiapan

Larutkan *potassium tellurite* dalam air dengan pemanasan suhu rendah.

Bahan bubuk sebaiknya dapat larut dalam air. Jika terdapat bahan putih yang tidak larut dalam air, buang bahan tersebut.

Sterilisasi dengan filtrasi menggunakan membran berukuran pori 0,2 µm (6.9).

Larutan dapat disimpan pada 5 °C (6.7) hingga satu bulan.

Buang larutan jika terbentuk endapan putih.

B.2.2.1.2 Larutan *bovine fibrinogen***B.2.2.2.1 Komposisi**

<i>Bovine fibrinogen</i>	5 g to 7 g ^a
Air steril	100 ml
^a Tergantung pada kemurnian <i>bovine fibrinogen</i> .	

B.2.2.2.2 Penyiapan

Dalam kondisi aseptik, larutkan *bovine fibrinogen* dalam air sesaat sebelum digunakan.

B.2.2.3 Larutan *rabbit plasma* dan *trypsin inhibitor***B.2.2.3.1 Komposisi**

<i>Rabbit plasma with ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) for coagulase (EDTA coagulase plasma)</i>	30 ml
<i>Trypsin inhibitor</i>	30 mg

B.2.2.3.2 Penyiapan

Secara aseptik, larutkan *trypsin inhibitor* dalam *rabbit plasma*, sesaat sebelum digunakan.

B.2.3 Medium RPFA lengkap

B.2.3.1 Komposisi

Medium dasar (lihat B.2.1)	90 ml
Larutan <i>potassium tellurite</i> (lihat B.2.2.1)	0,25 ml
Larutan <i>bovine fibrinogen</i> (lihat B.2.2.2)	7,5 ml
Larutan <i>rabbit plasma</i> dan <i>trypsin inhibitor</i> (lihat B.2.2.3)	2,5 ml

B.2.3.2 Penyiapan

Lelehkan medium dasar, selanjutnya biarkan dingin pada 44 °C hingga 47 °C dalam penangas air (6.3).

Secara aseptik, tambahkan tiga larutan (lihat B.2.2.1, B.2.2.2, dan B.2.2.3) yang sebelumnya dihangatkan pada 44 °C hingga 47 °C dalam penangas air. Campurkan secara merata setiap penambahan larutan dengan cara memutar untuk meminimalkan munculnya buih.

Gunakan medium lengkap segera setelah penyiapan, untuk menghindari adanya endapan plasma. Waktu tunggu medium cair untuk digunakan harus sesegera mungkin (lihat ISO 11133).

PERINGATAN — Jika menggunakan larutan *bovine fibrinogen/rabbit plasma* yang tersedia secara komersial, ikuti dengan seksama petunjuk pabrikan untuk penyiapan larutan dan medium lengkap (khususnya suhu medium dasar). Jika tidak, medium dapat kehilangan aktivitasnya.

B.3 Uji kinerja

Definisi produktivitas, selektivitas, dan spesifisitas dijelaskan dalam ISO 11133. Secara umum, ikuti prosedur uji kinerja yang dijelaskan dalam ISO 11133. Uji kinerja lebih lanjut ditunjukkan dalam Tabel B.1.

Tabel B.1 — Uji kinerja untuk jaminan mutu media biakan dan pereaksi

Medium	Tipe ^e	Fungsi	Inkubasi	Strain kontrol	Nomor WDCM ^a	Media referensi	Metode kontrol	Kriteria ^c	Reaksi karakteristik
RPFA	S	Produktivitas	(24 ± 2) jam / 34 °C hingga 38 °C	<i>Staphylococcus aureus</i>	00034 ^b 00032	<i>Tryptone soya agar (TSA)</i>	Kuantitatif	$P_R \geq 0,5$	Koloni berwarna hitam atau abu-abu dengan <i>opacity halo</i>
		Selektivitas	(48 ± 4) jam / 34 °C hingga 38 °C	<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 atau 00013	—	Kualitatif	Penghambatan total (0)	—
		Spesifisitas	(24 ± 2) jam hingga (48 ± 4) jam / 34 °C hingga 38 °C	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> or <i>Staphylococcus epidermidis</i>	00159 ^b 00036	—	Kualitatif	1 (pertumbuhan lemah) atau 2 (pertumbuhan baik)	jika tumbuh, koloni berwarna hitam atau abu-abu tanpa <i>opacity halo</i>

^a Gunakan acuan katalog referensi strain di <http://www.wfcc.info> untuk informasi nomor *strain* koleksi biakan dan rincian kontak; WDCM: *World Data Centre for Microorganisms*.

^b *Strain* yang harus digunakan setidaknya oleh laboratorium pengguna.

^c Pertumbuhan dikategorikan sebagai: 0: tidak ada pertumbuhan; 1: pertumbuhan lemah (penghambatan sebagian); 2: pertumbuhan baik; PR adalah rasio produktivitas (lihat ISO 11133).

^d *Strain* pilihan bebas, minimal salah satu *strain* harus digunakan.

^e S: medium padat.

Lampiran C
(informatif)
Hasil dari studi antar-laboratorium

Studi antar-laboratorium internasional diselenggarakan oleh *Laboratory for Study and Research on Hygiene and Quality of Food* (LERHQA) dari *French Food Safety Agency* (AFSSA) pada tahun 1999, dalam kerangka proyek *European project SMT CT 96 2098* yang diberikan oleh Komisi Eropa (lihat Referensi [12]). Studi ini melibatkan 24 laboratorium dari 16 negara di Eropa dan dilakukan pada keju, daging, bubuk telur, dan material referensi. Masing-masing contoh uji pangan tersebut dikontaminasi secara buatan pada tiga tingkat yang berbeda dengan *staphylococci* koagulase-positif, dan disediakan pula kontrol negatif.

Metode yang digunakan untuk studi antar-laboratorium seperti yang diberikan dalam Standar ini. Data presisi yang berasal dari studi antar-laboratorium ini ditunjukkan dengan mengacu pada setiap jenis contoh dalam Tabel C.1 hingga C.4. Data tersebut telah dihitung menggunakan uji statistik yang handal, sebagaimana dijelaskan dalam ISO 16140:2003.

Tabel C.1 — Hasil analisis data yang diperoleh pada keju

Parameter	Keju (tingkat kontaminasi dari <i>staphylococci</i> koagulase-positif)		
	Tingkat rendah	Tingkat Sedang	Tingkat tinggi
Jumlah kolaborator yang berpartisipasi	19	19	19
Jumlah kolaborator yang dipertahankan setelah evaluasi data	18	18	18
Jumlah contoh per laboratorium	2	2	2
Jumlah contoh yang diterima	36	36	36
Nilai median (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	3,25	5,03	6,00
Standar deviasi keberulangan (<i>repeatability</i>), s_r (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	0,09	0,04	0,06
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,25	0,13	0,17
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	1,78	1,35	1,48
Standar deviasi reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>), s_R (\log_{10} koloni/g)	0,09	0,12	0,11
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,27	0,33	0,32
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	1,86	2,14	2,09

Tabel C.2 — Hasil analisis data yang diperoleh pada daging

Parameter	Daging (tingkat kontaminasi dari <i>staphylococci</i> koagulase-positif)		
	Tingkat rendah	Tingkat Sedang	Tingkat tinggi
Jumlah kolaborator yang berpartisipasi	20	20	20
Jumlah kolaborator yang dipertahankan setelah evaluasi data	17	17	17
Jumlah contoh per laboratorium	2	2	2
Jumlah contoh yang diterima	34	34	34
Nilai median (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	3,16	4,13	6,08
Standar deviasi keberulangan (<i>repeatability</i>), s_r (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	0,09	0,07	0,07
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,25	0,21	0,21
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	1,78	1,62	1,62
Standar deviasi reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>), s_R (\log_{10} koloni/g)	0,11	0,10	0,12
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,32	0,28	0,33
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	2,09	1,91	2,14

Tabel C.3 — Hasil analisis data yang diperoleh pada serbuk telur

Parameter	Serbuk telur (tingkat kontaminasi dari <i>staphylococci</i> koagulase-positif)		
	Tingkat rendah	Tingkat Sedang	Tingkat tinggi
Jumlah kolaborator yang berpartisipasi	20	20	20
Jumlah kolaborator yang dipertahankan setelah evaluasi data	19	19	19
Jumlah contoh per laboratorium	2	2	2
Jumlah contoh yang diterima	38	38	38
Nilai median (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	3,25	4,20	5,32
Standar deviasi keberulangan (<i>repeatability</i>), s_r (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	0,12	0,06	0,09
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,33	0,17	0,25
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	2,14	1,48	1,78
Standar deviasi reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>), s_R (\log_{10} koloni/g)	0,14	0,11	0,14
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,38	0,32	0,39
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	2,40	2,09	2,45

Tabel C.4 — Hasil analisis data yang diperoleh pada material referensi

Parameter	Material referensi ^a (kapsul mengandung sekitar 5.000 koloni)
Jumlah kolaborator yang berpartisipasi	20
Jumlah kolaborator yang dipertahankan setelah evaluasi data	19
Jumlah contoh per laboratorium	2
Jumlah contoh yang diterima	38
Nilai median (\log_{10} koloni/g)	3,85
Standar deviasi keberulangan (<i>repeatability</i>), s_r (\log_{10} koloni/g ATAU koloni/g)	0,06
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,17
Batas keberulangan (<i>repeatability</i>) r , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	1,48
Standar deviasi reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>), s_R (\log_{10} koloni/g)	0,11
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai perbedaan dalam skala \log_{10} (\log_{10} koloni/g)	0,31
Batas reproduksiabilitas (<i>reproducibility</i>) R , sebagai rasio pada skala normal (koloni/g)	2,04
^a Material referensi disiapkan oleh RIVM, Belanda.	

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium

WARNING — In order to safeguard the health of laboratory personnel, it is essential that tests for enumerating staphylococci are only undertaken in properly equipped laboratories, under the control of a skilled microbiologist and that great care is taken in the disposal of all incubated materials. Persons using this document should be familiar with normal laboratory practice. This document does not purport to address all of the safety aspects, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user to establish appropriate safety and health practices.

1 Scope

This document specifies a horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci by counting the colonies obtained on a solid medium (rabbit plasma fibrinogen agar medium) after aerobic incubation at 34 °C to 38 °C (see Reference [10]).

This document is applicable to:

- products intended for human consumption;
- products intended for animal feeding;
- environmental samples in the area of food and feed production and handling;
- samples from the primary production stage.

This horizontal method was originally developed for the examination of all samples belonging to the food chain.

Because of the large variety of products in the food chain, it is possible that this horizontal method is not appropriate in every detail for all products. Nevertheless, it is expected that the required modifications are minimized so that they do not result in a significant deviation from this horizontal method.

Based on the information available at the time of publication of this document, this method is not considered to be (fully) suited to the examination of fermented products or other products containing technological flora based on *Staphylococcus* spp. (e.g. *S. xylosus*) (such as cheeses made from raw milk and certain raw meat products) likely to be contaminated by:

- staphylococci forming atypical colonies on a Baird-Parker agar medium;
- background flora that can obscure the colonies being sought.

Nevertheless, both ISO 6888-1 and this document are given equivalent status.

2 Normative references

The following documents are referred to in the text in such a way that some or all of their content constitutes requirements of this document. For dated references, only the edition cited

applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 6887 (all parts), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply. ISO and IEC maintain terminological databases for use in standardization at the following addresses:

- ISO Online browsing platform: available at <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: available at <http://www.electropedia.org/>

3.1

coagulase-positive staphylococci

bacteria that form typical colonies in a selective culture medium (rabbit plasma fibrinogen agar medium)

Note 1 to entry: The typical colonies are described in 9.3.

3.2

enumeration of coagulase-positive staphylococci

determination of the number of *coagulase-positive staphylococci* (3.1) per gram, per millilitre, per square centimetre or per sampling device/sampled area.

Note 1 to entry: A sampled area is an area not defined by a numerical size, for example, a hot tap, a door handle.

4 Principle

4.1 General

Preparation of poured plate of the rabbit plasma fibrinogen agar medium, with a specified quantity of the test sample if the product is liquid or with a specified quantity of the initial suspension in the case of other products.

Inoculation, under the same conditions, using decimal dilutions of the test sample, follow the procedure(s) in accordance with ISO 7218.

NOTE The volume of rabbit plasma fibrinogen agar medium to be added to the inoculum is a critical point for the coagulase method and reaction.

4.2 Incubation

Aerobic incubation of the plates at 34 °C to 38 °C and examination after 24 h and, if necessary, after 48 h.

4.3 Enumeration

Calculation of the number of coagulase-positive staphylococci per gram of sample, per millilitre of sample, per square centimetre or per sampling device from the number of typical colonies obtained on plates at dilution levels chosen to give a significant result within the counting limits of the method and in accordance with ISO 7218.

NOTE See Annex A for a flow diagram.

5 Culture media and reagents

Follow current laboratory practices in accordance with ISO 7218.

The composition of culture media and reagents and their preparation are specified in Annex B. For performance testing of culture media and reagents, follow the procedures in accordance with either Annex B or ISO 11133, or both.

For diluent(s), see the relevant part of the ISO 6887 series.

6 Equipment and consumables

Disposable equipment is an acceptable alternative to reusable glassware if it has suitable specifications.

Usual microbiological laboratory equipment (see ISO 7218) and, in particular, the following.

6.1 Apparatus for dry sterilization (oven) and wet sterilization (autoclave).

See ISO 7218.

6.2 Incubator, capable of maintaining the inoculated media, within the temperature range 34 °C to 38 °C.

NOTE The range 34 °C to 38 °C for incubation of media includes the use of incubators set at 35 °C ± 1 °C, 36 °C ± 2 °C or 37 °C ± 1 °C.

6.3 Water bath, or similar apparatus, capable of being maintained at 44 °C to 47 °C.

6.4 Sterile Petri dishes, with a diameter of approximately 90 mm, made of glass or plastic.

6.5 Sterile graduated pipettes or automatic pipettes of nominal capacities 1 ml, 2 ml and 10 ml, graduated in 0,1 ml, 0,1 ml and 0,5 ml divisions, respectively. See ISO 7218.

Graduated pipettes and pipettor tips should be fitted with a non-absorbent cotton wool plug to prevent contamination when used to manipulate microbial cultures.

6.6 pH-meter, capable of being read to the nearest 0,01 pH unit, enabling measurements to be made with a tolerance of $\pm 0,1$ pH unit. The pH meter shall be equipped with either manual or automatic temperature compensation. See ISO 7218.

6.7 Refrigerator, capable of operating at $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.8 Sterile tubes, bottles or flasks with caps, of appropriate capacity. Bottles or flasks with non-toxic metallic or plastic screw-caps may be used.

6.9 Membranes, with $0,2\text{ }\mu\text{m}$ pore size.

7 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this document. Follow the specific International Standard dealing with the product concerned. If there is no specific International Standard dealing with the sampling of the product concerned, the parties concerned should come to an agreement on this subject.

Recommended sampling techniques are given in the following documents:

- ISO/TS 17728 for food and animal feed;
- ISO 707 for milk and milk products;
- ISO 6887-3 for fish and fishery products;
- ISO 13307 for the primary production stage;
- ISO 17604 for carcasses;
- ISO 18593 for surfaces.

It is important that the laboratory receive a sample that is representative. The sample should not have been damaged or changed during transport or storage.

8 Preparation of the test sample

Prepare the test sample from the laboratory sample in accordance with the specific International Standard dealing with the product concerned: follow the procedures specified in the ISO 6887 series and if necessary ISO 18593. If there is no specific International Standard available, the parties concerned should come to an agreement on this subject.

9 Procedure (see Figure A.1)

9.1 Test portion, initial suspension and dilutions

See the relevant part of the ISO 6887 series.

9.2 Inoculation and incubation

Transfer, by means of a sterile pipette (6.5), 1 ml of the test sample if liquid, or 1 ml of the initial suspension (10^{-1} dilution) in the case of other products, to a Petri dish (see Annex B). For

enumeration techniques in microbiology of the food chain, the number of Petri dishes to be used, according to the tested dilutions, is stated in ISO 7218. Repeat the procedure for further decimal dilutions if necessary.

Into each Petri dish (6.4), immediately pour 18 ml to 20 ml freshly prepared complete medium (B.2.3) to obtain a depth of at least 3 mm.

Carefully mix the inoculum with the culture medium and leave to solidify by placing the Petri dishes on a horizontal surface.

After complete solidification, invert the dishes prepared above and place them in the incubator (6.2) set at 34 °C to 38 °C. After incubation for 24 h ± 2 h, mark on the bottom of the plates the positions of any typical colonies present. If no colonies or no typical colonies are obtained at 24 h ± 2 h, re-incubate all plates at 34 °C to 38 °C for a further 24 h ± 2 h (to a total of 48 h ± 4 h), and mark any typical colonies.

NOTE Even if there is an inhibitor of trypsin in the RPFA medium, colonies with typical appearance after 24 h ± 2 h incubation can lose typical appearance after 48 h ± 4 h incubation, due to enzymatic processes (trypsin) or due to overgrowth.^[11] Counting only at 48 h ± 4 h can lead to low counts or no counts.

9.3 Counting of colonies

9.3.1 General description of colonies growing on RPFA medium

Typical colonies are black or grey or even white, small and are surrounded by an opacity halo of precipitation, indicating coagulase activity. *Proteus* colonies can appear to look like those of coagulase-positive staphylococci early on in the incubation. However, they can be distinguished from staphylococci after 24 h ± 2 h and 48 h ± 4 h of incubation, as their colonies become more or less brownish and start to spread.

9.3.2 Colony counting procedure

At the end of the incubation period (see 9.2), count the typical colonies in each dish. At reading the plates after 24 h, mark on the bottom of the plates the positions of any typical colonies present before further incubation.

If plates are re-incubated at 34 °C to 38 °C for 24 h ± 2 h, mark any new typical colonies. For enumeration, only retain plates containing a maximum of 300 colonies, with 100 typical colonies.

One of the plates shall contain at least 10 colonies.

NOTE As the rabbit plasma fibrinogen agar medium is based on a coagulase reaction, it is not necessary to confirm this activity.

When the number of cfu is expected to be at or near the limit of determination, the use of duplicate plates is preferable. If duplicate plates are used the minimum for the sum of colonies should be 10. In this case, the level of contamination is expected to be higher than 5 cfu/ml for liquid samples or higher than 50 cfu/g for solid samples.

10 Expression of results

For calculation of the results, follow the procedure(s) in accordance with ISO 7218. Calculate and report the results as the number of coagulase-positive staphylococci in cfu (colony forming unit) per gram, millilitre, per square centimetre or per sampling device.

In cases where no colonies of the target microorganism have been detected, follow ISO 7218 for the expression of results for special cases.

11 Performance characteristics of the method

11.1 Interlaboratory study

Results of the interlaboratory study to determine the precision of the method are summarized in Annex C. Repeatability and reproducibility limits were determined using four sample types (cheese, meat, egg powder and reference materials) contaminated at various levels.

The values derived from the interlaboratory study may not be applicable to concentration ranges and sample types other than those given in Annex C.

11.2 Repeatability limit

The absolute difference between two single (\log_{10} -transformed) test results (number of coagulase-positive staphylococci per gram or per millilitre) or the ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment within the shortest feasible time interval will, in no more than 5 % of cases, exceed the repeatability limit r .

As a general indication of the repeatability limit r , the following values (medians of values per matrix and contamination level, see Annex C) may be used when testing food samples in general:

- $r = 0,22$, range [0,13; 0,33] (expressed as an absolute difference between \log_{10} -transformed test results); or
- $r = 1,70$, range [1,35; 2,14] (expressed as a ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale).

EXAMPLE A first test result of 10 000 or $1,0 \times 10^4$ or $\log_{10} 4,00$ of coagulase-positive staphylococci per gram of food was observed in a given laboratory. Under repeatability conditions, the difference between \log_{10} -transformed results is not intended to be greater than $\pm 0,22 \log_{10}$ units. So the result from a second test result of the same sample is expected to be between 3,78 ($4,00 - 0,22$) \log_{10} units and 4,22 ($4,00 + 0,22$) \log_{10} units. For non-log-transformed results, the ratio between the first test result and the second test result from the same sample is not intended to be greater than 1,70. So the second test result is expected to be between 5 882 (= $10\ 000/1,70$) cfu per gram and 17 000 (= $100\ 000 \times 1,70$) cfu per gram. For reference materials (capsules containing approximately 5 000 cfu, see Annex C), the following values may be used:

- $r = 0,17$ (expressed as an absolute difference between \log_{10} -transformed test results); or
- $r = 1,48$ (expressed as a ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale).

11.3 Reproducibility limit

The absolute difference between two single (\log_{10} -transformed) test results (number of coagulase-positive staphylococci per gram or per millilitre) or the ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale, obtained using the same method on identical test material in different laboratories with different operators using different equipment, will, in no more than 5 % of cases, exceed the reproducibility limit R .

As a general indication of the reproducibility limit R , the following overall values (medians of values per matrix and contamination level, see Annex C) can be used when testing food samples in general:

- $R = 0,33$, range [0,27; 0,39] (expressed as a difference between \log_{10} -transformed test results); or
- $R = 2,20$, range [1,86; 2,45] (expressed as a ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale).

EXAMPLE 1 A test result of 10 000 or $1,0 \times 10^4$ or $\log_{10} 4,00$ coagulase-positive staphylococci per gram of food product was obtained in a first laboratory. Under reproducibility conditions, the difference between \log_{10} -transformed results is not intended to be greater than $\pm 0,33 \log_{10}$ units. So the results from a second laboratory are expected to be between 3,67 ($4,00 - 0,33$) \log_{10} units and 4,33 ($4,00 + 0,33$) \log_{10} units. For non-log-transformed results, the ratio between the test results from this first laboratory and a second laboratory is not intended to be greater than 2,20. So the result from the second laboratory is expected to be between 4 545 ($= 10\ 000/2,20$) cfu per gram and 22 000 ($= 10\ 000 \times 2,20$) cfu per gram.

EXAMPLE 2 A laboratory wants to know the maximum level it can find, which is still in compliance with a pre-set limit (e.g. a limit of 10^5 or $\log_{10} 5$). For this, the R value (on the log scale) is multiplied by a factor of $0,59^2$. The maximum value is 0,19 ($0,33 \times 0,59$) as a difference between \log_{10} -transformed test results or 1,55 ($10^{0,19}$) as a ratio between test results. So, results up to $\log_{10} 5,19$ ($\log_{10} 5 + \log_{10} 0,19$) or 15 500 ($= 10\ 000 \times 1,55$) indicate compliance with the limit.

For reference materials (capsules containing approximately 5 000 cfu, see Annex C), the following values may be used:

- $R = 0,31$ (expressed as a difference between \log_{10} -transformed test results); or
- $R = 2,04$ (expressed as a ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale).

12 Test report

The test report shall specify, at least the following information/aspects:

- the test method used, with reference to this document, i.e. ISO 6888-2:2021;
- the sampling method used, if known;

² The factor 0,59 reflects the fact that a test with a one-sided 95 % interval is used to test whether the limit is exceeded; it is obtained from the following formula: $0,59 = 1,64 / (1,96 \times \sqrt{2})$.

RSNI3 ISO 6888-2:2021

- all operating conditions not specified in this document, or regarded as optional, together with details of any incidents that could have influenced the test result(s);
- any deviations from this document;
- all information necessary for the complete identification of the sample;
- the test result(s) obtained after 24 h \pm 2 h or after 48 h \pm 4 h;
- measurement uncertainty
- the date of the test.

13 Quality assurance

The laboratory should have a clearly defined quality control system to ensure that the equipment, reagents and techniques are suitable for the method. The use of positive controls, negative controls and blanks are part of the method. Performance testing of culture media and reagents is specified in Annex B and described in ISO 11133.

Annex A
(normative)
Flow diagram of the procedure

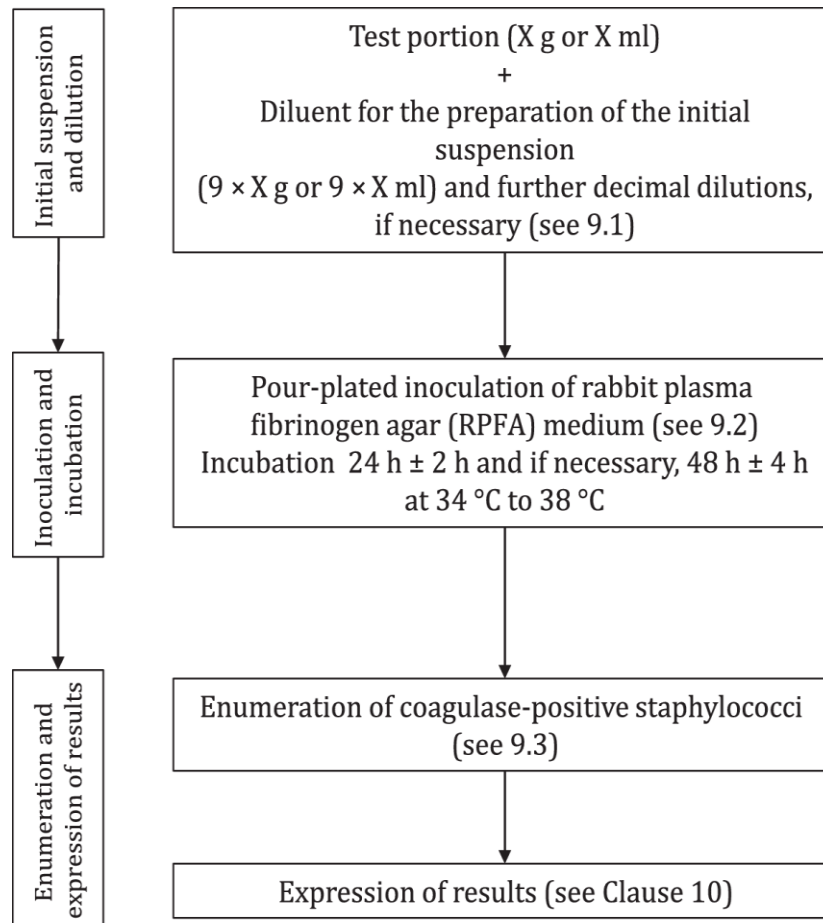


Figure A.1 — Flow diagram of procedure for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) using RPFA medium

Annex B
(normative)
Culture media and reagents

B.1 General

The general specifications of ISO 11133 are applicable to the preparation and performance testing of the culture media described in this annex. If culture media or reagents are prepared from dehydrated complete media/reagents or if ready-to-use media/reagents are used, follow the manufacturer's instructions regarding preparation, storage conditions, expiry date and use. The shelf life of the media and reagents indicated in this annex has been determined in some studies. The user shall verify these under their own storage conditions (in accordance with ISO 11133).

Performance testing of culture media is described in B.3.

B.2 RPFA medium**B.2.1 Base medium****B.2.1.1 Composition**

Enzymatic digest of casein	10,0 g
Yeast extract	1,0 g
Meat extract	5,0 g
Sodium pyruvate (CAS Number 113-24-6)	10,0 g
Glycine (CAS Number 56-40-6)	12,0 g
Lithium chloride (CAS Number 7447-41-8)	5,0 g
Agar	12 g to 22 g ^a
Water, to a final volume of	1 000 ml
^a Depending on the gel strength of the agar.	

B.2.1.2 Preparation

Dissolve the components or the dehydrated complete base in the water by boiling.

Adjust the pH (6.6), if necessary, so that after sterilization it is $7,2 \pm 0,2$ at 25 °C.

Dispense the medium in quantities of 90 ml into flasks or bottles (6.8) of appropriate capacity. Sterilize for 15 min in the autoclave (6.1) set at 121 °C.

Store the medium in closed containers at 5 °C (6.7) for up to six months.

B.2.2 Solutions for RPFA medium**B.2.2.1 Potassium tellurite solution****B.2.2.1.1 Composition**

Potassium tellurite ^a (K ₂ TeO ₃) (CAS Number 7790-58-1)	1,0 g
Water	100 ml
^a It should be ensured beforehand that the potassium tellurite available is suitable for this test (see B.2.2.1.2).	

B.2.2.1.2 Preparation

Dissolve the potassium tellurite completely in the water with minimal heating.

The powder should be readily soluble. If a white insoluble material is present in the water, discard the powder.

Sterilize by filtration using 0,2 µm pore size membranes (6.9).

The solution may be stored at 5 °C (6.7) for up to one month.

Discard the solution if a white precipitate forms.

B.2.2.2 Bovine fibrinogen solution

B.2.2.2.1 Composition

Bovine fibrinogen	5 g to 7 g ^a
Sterile water	100 ml
^a Depending on the purity of the bovine fibrinogen.	

B.2.2.2.2 Preparation

Under aseptic conditions, dissolve the bovine fibrinogen in the water just prior to use.

B.2.2.3 Rabbit plasma and trypsin inhibitor solution

B.2.2.3.1 Composition

Rabbit plasma with ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) for coagulase plasma)	30 ml
Trypsin inhibitor	30 mg

B.2.2.3.2 Preparation

Under aseptic conditions, dissolve the trypsin inhibitor in the rabbit plasma, just prior to use.

B.2.3 Complete RPFA medium

B.2.3.1 Composition

Base medium (see B.2.1)	90 ml
Potassium tellurite solution (see B.2.2.1)	0,25 ml
Bovine fibrinogen solution (see B.2.2.2)	7,5 ml
Rabbit plasma and trypsin inhibitor solution (see B.2.2.3)	2,5 ml

B.2.3.2 Preparation

Melt the base medium, then let it cool down to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.3).

Under aseptic conditions, add the three solutions (see B.2.2.1, B.2.2.2 and B.2.2.3) previously warmed to 44 °C to 47 °C in a water bath. Mix thoroughly after each addition by rotation to minimize foaming.

Use the complete medium immediately after its preparation, in order to avoid any precipitation of the plasma. Hold the molten media for as short a time as possible (see ISO 11133).

WARNING — If a commercially available solution of bovine fibrinogen/rabbit plasma is used, follow with great care the manufacturer's instructions for the preparation of this solution and of the complete medium (in particular the temperature of the base medium). Otherwise, the medium can completely lose its activity.

B.3 Performance testing

The definitions of productivity, selectivity and specificity is specified in ISO 11133. In general, follow the procedures for performance testing described in ISO 11133. Performance testing details are given in Table B.1.

Table B.1 — Performance testing for quality assurance of culture media and reagents

Medium	Type ^e	Function	Incubation	Control strain	WDCM number ^a	Reference media	Method of control	Criteria ^c	Characteristic reaction
RPFA	S	Productivity	(24 ± 2) h / 34 °C to 38 °C	<i>Staphylococcus aureus</i>	00034 ^b 00032	Tryptone soya agar (TSA)	Quantitative	$P_R \geq 0,5$	Black or grey colonies with opacity halo
		Selectivity	(48 ± 4) h / 34 °C to 38 °C	<i>Escherichia coli</i> ^d	00012 or 00013	—	Qualitative	Total inhibition (0)	—
		Specificity	(24 ± 2) h to (48 ± 4) h / 34 °C to 38 °C	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> or <i>Staphylococcus epidermidis</i>	00159 ^b 00036	—	Qualitative	1 (weak growth) or 2 (good growth)	If growth, black or grey colonies without opacity halo
^a Refer to the reference strain catalogue on at http://www.wfcc.info for information on culture collection strain numbers and contact details; WDCM: World Data Centre for Microorganisms. ^b Strain to be used as a minimum by the user laboratory. ^c Growth is categorized as: 0: no growth; 1: weak growth (partial inhibition); 2: good growth; P_R is the productivity ratio (see ISO 11133). ^d Strain free of choice, one of the strains has to be used as a minimum. ^e S: solid medium.									

Annex C
(informative)
Results of the interlaboratory study

An international interlaboratory study was organized by the Laboratory for Study and Research on Hygiene and Quality of Food (LERHQA) of the French Food Safety Agency (AFSSA) in 1999, in the frame of the European project SMT CT 96 2098 granted by the European Commission (see Reference [12]). This study involved 24 laboratories in 16 countries in Europe and was carried out on cheese, meat, egg powder and a reference material. The food samples were each artificially contaminated at three different levels with coagulase-positive staphylococci, plus a negative control.

The method used in the interlaboratory study is the method given in this document. The precision data derived from this interlaboratory study are shown with respect to each sample type in Tables C.1 to C.4. They have been calculated using robust statistics, as described in ISO 16140:2003.

Table C.1 — Results of data analysis obtained with cheese

Parameter	Cheese (contamination level of coagulase-positive staphylococci)		
	Low level	Medium level	High level
Number of participating collaborators	19	19	19
Number of collaborators retained after evaluation of the data	18	18	18
Number of samples per laboratory	2	2	2
Number of accepted samples	36	36	36
Median value (\log_{10} cfu/g)	3,25	5,03	6,00
Repeatability standard deviation, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,09	0,04	0,06
Repeatability limit r , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,25	0,13	0,17
Repeatability limit r , as ratio on normal scale (cfu/g)	1,78	1,35	1,48
Reproducibility standard deviation, s_R (in \log_{10} cfu/g)	0,09	0,12	0,11
Reproducibility limit R , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,27	0,33	0,32
Reproducibility limit R , as ratio on normal scale (cfu/g)	1,86	2,14	2,09

Table C.2 — Results of data analysis obtained with meat

Parameter	Meat (contamination level of coagulase-positive staphylococci)		
	Low level	Medium level	High level
Number of participating collaborators	20	20	20
Number of collaborators retained after evaluation of the data	17	17	17
Number of samples per laboratory	2	2	2
Number of accepted samples	34	34	34
Median value (\log_{10} cfu/g)	3,16	4,13	6,08
Repeatability standard deviation, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,09	0,07	0,07
Repeatability limit r , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,25	0,21	0,21
Repeatability limit r , as ratio on normal scale (cfu/g)	1,78	1,62	1,62
Reproducibility standard deviation, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,11	0,10	0,12
Reproducibility limit R , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,32	0,28	0,33
Reproducibility limit R , as ratio on normal scale (cfu/g)	2,09	1,91	2,14

Table C.3 — Results of data analysis obtained with egg powder

Parameter	Egg powder (contamination level of coagulase-positive staphylococci)		
	Low level	Medium level	High level
Number of participating collaborators	20	20	20
Number of collaborators retained after evaluation of the data	19	19	19
Number of samples per laboratory	2	2	2
Number of accepted samples	38	38	38
Median value (\log_{10} cfu/g)	3,25	4,20	5,32
Repeatability standard deviation, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,12	0,06	0,09
Repeatability limit r , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,33	0,17	0,25
Repeatability limit r , as ratio on normal scale (cfu/g)	2,14	1,48	1,78
Reproducibility standard deviation, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,14	0,11	0,14
Reproducibility limit R , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,38	0,32	0,39
Reproducibility limit R , as ratio on normal scale (cfu/g)	2,40	2,09	2,45

Table C.4 — Results of data analysis obtained with reference materials

Parameter	Reference material ^a (capsules containing around 5.000 cfu)
Number of participating collaborators	20
Number of collaborators retained after evaluation of the data	19
Number of samples per laboratory	2
Number of accepted samples	38
Median value (\log_{10} cfu/g)	3,85
Repeatability standard deviation, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,06
Repeatability limit r , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,17
Repeatability limit r , as ratio on normal scale (cfu/g)	1,48
Reproducibility standard deviation, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,11
Reproducibility limit R , as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g)	0,31
Reproducibility limit R , as ratio on normal scale (cfu/g)	2,04

^a Reference material was prepared by RIVM, Netherlands.

Bibliografi

- [1] ISO 707, *Milk and milk products — Guidance on sampling*
- [2] ISO 6888-1, *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium*
- [3] ISO 6888-3, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 3: Detection and MPN technique for low numbers*
- [4] ISO 13307, *Microbiology of food and animal feed — Primary production stage — Sampling techniques*
- [5] ISO 16140:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative method*
- [6] ISO 17604, *Microbiology of the food chain — Carcass sampling for microbiological analysis*
- [7] ISO 17468, *Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method*
- [8] ISO/TS 17728, *Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples*
- [9] ISO 18593, *Microbiology of the food chain — Horizontal methods for surface sampling*
- [10] IDF 145A:1997, *Milk and milk products — Enumeration of coagulase-positive staphylococci — Colony-count technique*
- [11] Boothby J., Genigeorgis C. And Fanelli M.J. Tandem Coagulase / Thermonuclease Agar Method For The Detection Of *Staphylococcus Aureus*. Appl. And Environmental Microbiology. 1979, Vol.37, Pp. 298-302.
- [12] De Buyser M.L., Lombard B., Schulten S.M., In't Veld P.H., Scotter S.L., Rollier P., Lahellec C. Validation Of En Iso Standard Methods 6888 Part 1 And Part 2:1999, Enumeration Of Coagulase-Positive Staphylococci In Foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **83**(2), Pp. 185–194
- [13] KLOOS W.E. *Systematics And The Natural History Of Staphylococci*. In: Staphylococci, *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 1990, **69**, Pp. 25 S–37 S; And Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology 2nd Edition, Vol 3, 2009, Pp 372-421

Informasi perumus SNI

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 19-05 Metode Pengujian Mikrobiologi

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Harsi D. Kusumaningrum
Sekretaris : Bety Wahyu Hapsari
Anggota : Eti Kurniawati
Ika Kartika Syarifah
Retno Wulansari
Seruni Agistiana
Dini Apriori
Puspita Lisdiyanti
Murtiningsih
Eni Cahyaningsih
Tika Nur Pusparani
Lisa Amelia
Mien Ambarwati
Yayan Ariyanto
Dwi Kusuma Indriani
Devy Rameiyanti

[3] Konseptor Rancangan SNI

Gugus Kerja Sekretariat Komite Teknis 19-05 Metode Pengujian Mikrobiologi

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

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