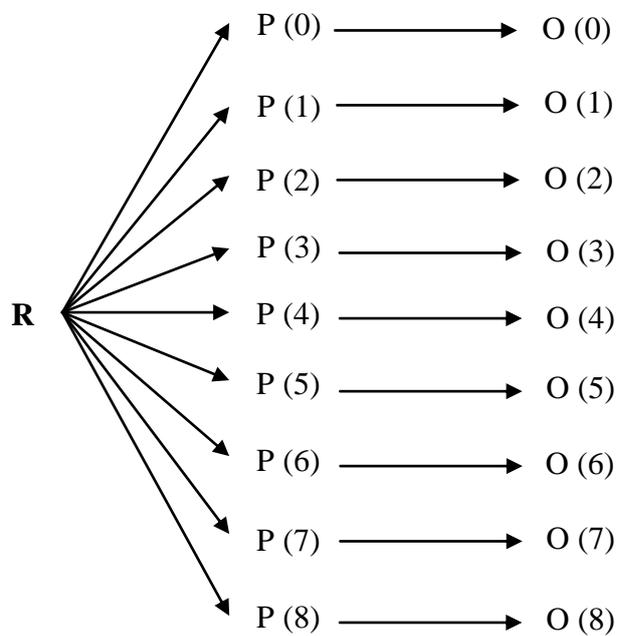


## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang digunakan bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui potensi perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) sebagai daya hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan 9 perlakuan. Desain penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1. Desain atau rancangan penelitian (Zainuddin, 2006 dalam penelitian Mufarriyah, 2013)

Keterangan :

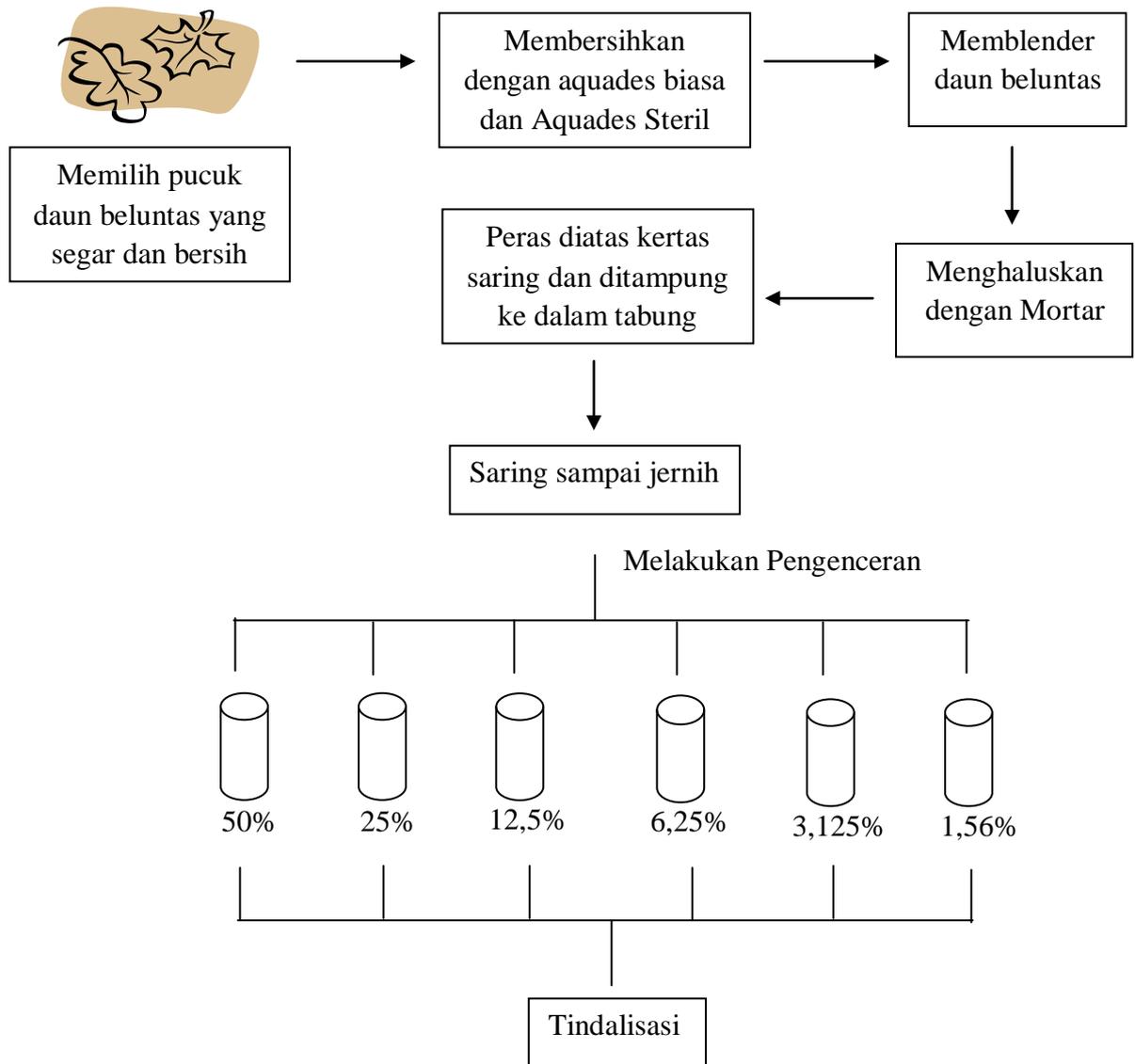
R = Random (pengambilan sampel secara acak)

P (0) = Suspensi bakteri tanpa perlakuan perasan daun beluntas (kontrol 0%)

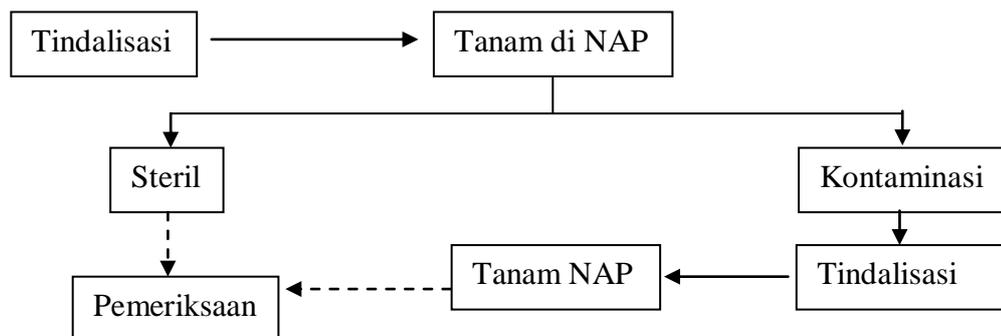
- P (1) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 100%
- P (2) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 50%
- P (3) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 25%
- P (4) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 12,5%
- P (5) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 6,25%
- P (6) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 3,125%
- P (7) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 1,56%
- P (8) = Suspensi bakteri dengan perlakuan perasan daun beluntas 0,78%
- O (0)= Observasi pertumbuhan bakteri tanpa ada perlakuan perasan (kontrol 0%)
- O (1)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 100%
- O (2)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 50%
- O (3)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 25%
- O (4)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 12,5%
- O (1)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 6,25%
- O (2)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 3,125%
- O (3)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 1.56%
- O (4)= Observasi pertumbuhan bakteri dengan perlakuan perasan 0,78%

### **3.2 Kerangka Kerja**

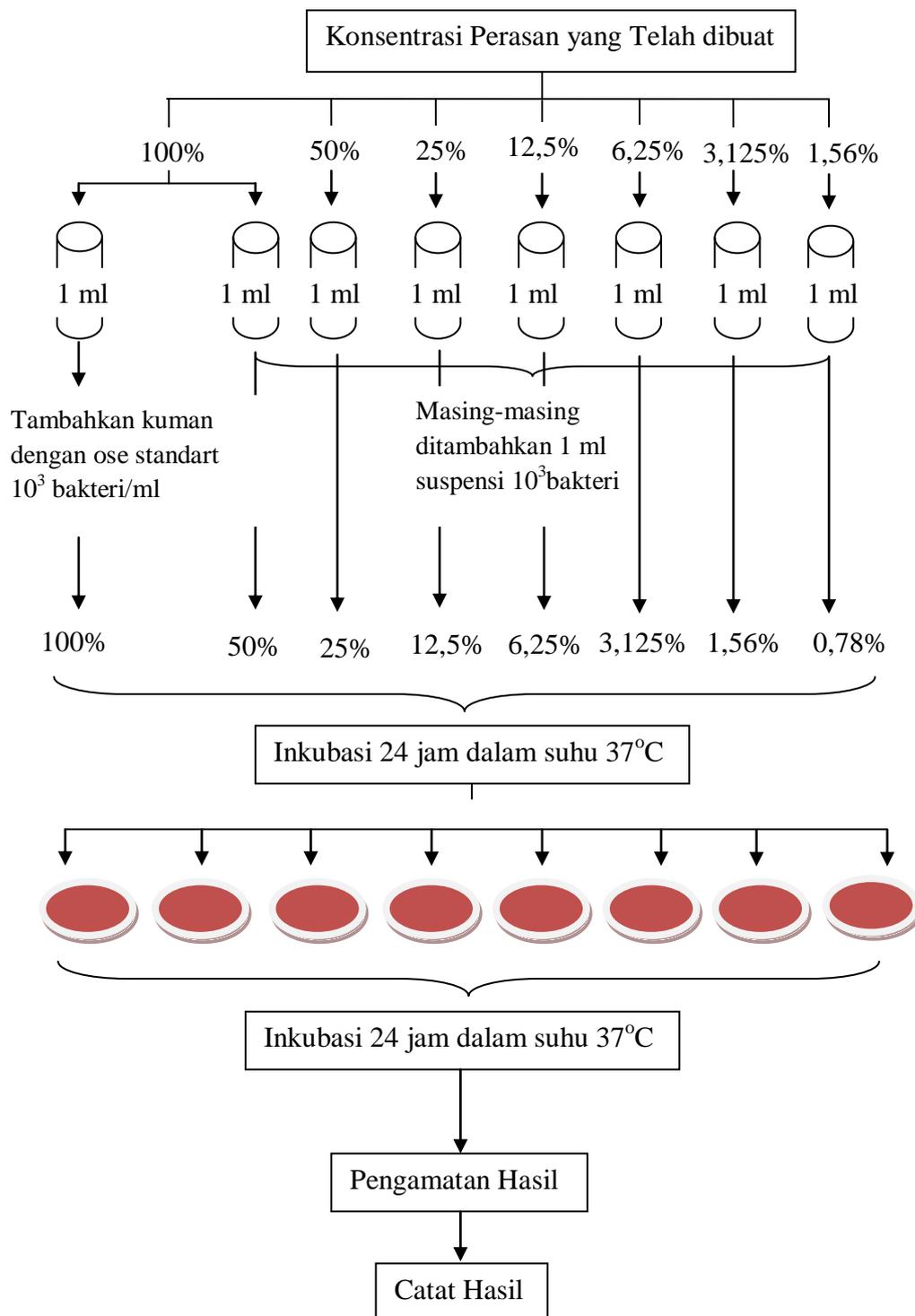
Kerangka dalam penelitian ini meliputi prosedur pembuatan konsentrasi perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less), proses alur tindalisasi hingga penanaman suspensi bakteri dalam perasan yang dikemas dalam bentuk kerangka skema kerja sebagai berikut :



Gambar 3.2 Skema Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less)



Gambar 3.2 Skema Alur Tindalisasi



Gambar 3.4 Skema Pemeriksaan dengan Penanaman Suspensi Bakteri

### 3.3 Populasi, Sample dan Sampling Penelitian

#### 3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah macam-macam bakteri biakan murni.

#### 3.3.2 Sampel dan Sampling Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang dipindah dari biakan murni dan tumbuh di media *Mac Conkey Agar* (MCA). Bakteri *Shigella dysenteriae* diambil secara random (acak).

Dalam penelitian terdapat 8 perlakuan konsentrasi dari perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) dan 1 perlakuan sebagai kontrol. Setiap perlakuan dilakukan masing-masing minimal 3 kali pengulangan yang diperoleh dari rumus dalam buku yang ditulis oleh Hidayat (2011) dan hasil replikasi sebagai berikut :

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

$$(9-1) (r-1) \geq 15$$

$$8 (r-1) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,875 \sim 3 \text{ (pengulangan)}$$

keterangan :

r : jumlah replikasi (pengulangan)

t : banyak kelompok perlakuan

Sehingga seluruhnya terdapat 3 pengulangan x 9 perlakuan = 27 unit percobaan.

Setiap 1 unit percobaan membutuhkan sampel sebanyak 1 ml suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* setara dengan standart neflometer *Mac Farland* 1 yang mengandung bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/ml

### **3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **3.4.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo No.59 Surabaya.

#### **3.4.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2014 sampai dengan bulan Juli 2015. Sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Maret 2015.

### **3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

#### **3.5.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas : konsentrasi perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less)

Variable terikat : pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*

Variabel kontrol : volume media, sterilisasi, volume suspensi bakteri, lama inkubasi.

#### **3.5.2 Definisi Operasional**

Definisi operasional variabel penelitian ini sebagai berikut :

1. Konsentrasi perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) merupakan daun beluntas segar yang dihancurkan dan diambil sari dari hasil perasan. Hasil perasan murni tersebut sebagai konsentrasi 100%, kemudian dilakukan pengenceran per volume aquades, dimana konsentrasi terdiri atas 50%, 25%,

12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,56% (dalam volume/volume). Sedangkan konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif tanpa perasan.

2. Pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media *Mac Conkey Agar* (MCA) pada masing-masing konsentrasi dalam bentuk perhitungan jumlah bakteri yang tetap tumbuh setelah 24 jam dan diberi perlakuan pada setiap media pertumbuhan, variabel pertumbuhan bakteri dalam skala rasio.

### **3.6 Metode Pengumpulan Data dan Analisis Data**

#### **3.6.1 Metode Pengumpulan Data**

Data yang menunjukkan daya hambat perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* diperoleh dari hasil laboratorium dengan langkah-langkah sebagai berikut :

##### **3.6.1.1 Persiapan Pemeriksaan**

###### **3.6.1.1.1 Persiapan Alat dan Bahan**

- a. Alat :
  1. Timbangan atau neraca analitik
  2. Blender dan mortar
  3. Erlenmeyer
  4. Kertas saring
  5. Tabung reaksi
  6. Kasa steril
  7. Rak tabung reaksi
  8. Beaker glass

9. Thermometer
  10. Api spirtus
  11. Kaki tiga dan kasa asbes
  12. Pipet volume
  13. Pipet ukur
  14. Gelas ukur
  15. Corong dan ose bulat
  16. Spidol permanen dan etiket
  17. Spatula dan batang pengaduk
  18. Autoclave
  19. Colony Counter
  20. Centrifuge
- b. Bahan :
1. Daun beluntas (*Pluchea indica* Less)
  2. Kertas bekas dan karet gelang
  3. Aquades biasa dan aquades steril
  4. Bakteri murni *Shigella dysenteriae*
  5. Media *Mac Conkey Agar* (MCA) dan *Nutrien Agar Plate* (NAP)
  6. Reagen Barium Klorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1 % dan Asam Sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1 %
  7. PZ (NaCl 0,85%-0,9%) Steril
  8. Reagen NaOH dan HCL untuk media

### 3.6.1.1.2 Cara Sterilisasi Alat dan Bahan

- a. Menggunakan Autoklaf (Sterilisasi basah)
  1. Membungkus semua alat dan bahan yang dibutuhkan dengan kertas bekas, bila perlu diikat dengan karet gelang.
  2. Mengisi bagian dasar autoklaf dengan aquades hingga batas tertentu
  3. Menutup sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas autoklaf.
  4. Memasukkan alat dan bahan yang akan disterilkan.
  5. Menutup autoklaf dengan seksama dan serapi mungkin dengan cara berlawanan.
  6. Membuka katup udara agar uap air dapat mengusir udara yang ada dalam autoklaf pada saat pemanasan.
  7. Apabila suhu telah mencapai  $10^{\circ}\text{C}$  tutuplah katup udara untuk meningkatkan tekanan uap di dalam autoklaf.
  8. Perhatikan kenaikan suhu atau tekanan uap apabila telah mencapai  $121^{\circ}\text{C}$  atau tekanan  $1,1 \text{ kg/cm}^2$ . Sterilisasi dipertahankan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tertentu.
  9. Membuka katup autoklaf dengan cara buka-tutup katup hingga tekanan uap turun.
  10. Membuka tutup autoklaf dengan hati-hati
  11. Mengeluarkan alat dan bahan-bahan yang telah disterilisasi (Novel dkk, 2010 dalam penelitian Anggi, 2014).

b. Menggunakan Oven (sterilisasi kering)

Sterilisasi kering digunakan untuk alat-alat yang tidak bisa masuk dalam autoklaf seperti pipet volume dan pipet ukur.

1. Membungkus semua alat dan bahan yang dibutuhkan dengan kertas bekas, bila perlu diikat dengan tali.
2. Masukkan kedalam oven dengan rapi.
3. Hidupkan oven, atur suhu yang digunakan 160°C dan waktu 60 menit.
4. Tunggu hingga waktu yang sudah ditentukan.

### **3.6.1.1.3 Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Beluntas**

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, blender, mortar, batang pengaduk, kasa steril, kertas saring, beaker glass, erlenmeyer, pipet volume 10 ml, pipet volume 5 ml, pipet ukur 10 ml, pipet ukur 1 ml.

Bahan yang digunakan adalah daun beluntas segar dan aquades steril.

Langkah kerja :

1. Daun beluntas segar yang telah dicuci dengan aquades hingga bersih di keringkan sebentar.
2. Memblender daun beluntas dan dihaluskan dengan mortar.
3. Daun yang sudah halus diperas dan disaring hingga jernih
4. Apabila masih keruh, mensentrifuge cairan hingga jernih, sehingga didapat konsentrasi 100%.

5. Dilanjutkan dengan membuat konsentrasi 50%, 25% sampai dengan 1,56% dengan cara sebagai berikut :
- a. Konsentrasi 100% : adalah hasil perasan murni daun beluntas tanpa pengenceran.
  - b. Konsentrasi 50% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 100% ditambah 1 ml aquades steril.
  - c. Konsentrasi 25% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 50% ditambah 1 ml aquades steril.
  - d. Konsentrasi 12,5% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 25% ditambah 1 ml aquades steril.
  - e. Konsentrasi 6,25% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 12,5% ditambah 1 ml aquades steril.
  - f. Konsentrasi 3,125% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 6,25% ditambah 1 ml aquades steril.
  - g. Konsentrasi 1,56% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 3,125% ditambah 1 ml aquades steril.
  - h. Konsentrasi 0,78% : adalah 1 ml perasan murni daun beluntas dari konsentrasi 1,56% ditambah 1 ml suspensi kuman.

#### 3.6.1.1.4 Uji Sterilitas Konsentrasi Perasan Daun Beluntas

1. Diambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media *Nutrien Agar Plate* (NAP), dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
2. Inkubasi selama 24 jam 37° C.
3. Diamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun beluntas tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media *Nutrien Agar Plate* (NAP) terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
  - a. Memanaskan perasan daun beluntas dengan waterbath pada suhu 90° C selama 30-60 menit
  - b. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
  - c. Diulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
  - d. Ditanam kembali perasan daun beluntas yang sudah melalui proses tindalisasi di media *Nutrien Agar Plate* (NAP) dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C

#### 3.6.1.1.5 Pembuatan Standar Neflometer *Mac Farland 1*

Alat yang digunakan adalah pipet ukur 1 ml dan 10 ml, tabung reaksi dan filler. Bahan yang digunakan adalah reagen Barium Klorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dan Asam Sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1%

Langkah kerja :

1. Menyiapkan tabung reaksi yang sudah dibersihkan.
2. Memipet 0,1 ml Barium Klorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dan dimasukkan kedalam tabung reaksi.

3. Memipet 9,9 ml Asam Sulfat ( $H_2SO_4$ ) 1% dan ditambahkan kedalam tabung sebelumnya.
4. Mencampurkan kedua larutan dalam tabung hingga homogen.
5. Didapatkan standart *Mac Farland* 1 dan setara dengan jumlah bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/ml

#### **3.6.1.1.6 Pembuatan Suspensi Bakteri *Shigella dysenteriae***

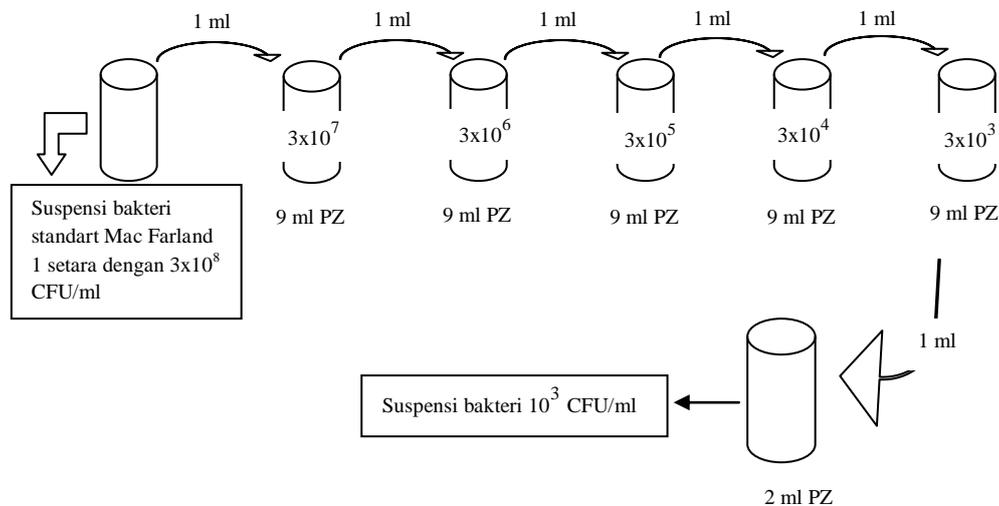
Alat yang digunakan meliputi pipet pastur, pipet ukur, pipet volume, ose bulat, tabung reaksi, rak tabung, dan kertas garis standart *Mac Farland*.

Bahan yang digunakan meliputi PZ steril dan biakan murni bakteri *Shigella dysenteriae*.

Langkah kerja :

1. Menyiapkan tabung reaksi dan diisi dengan PZ steril  $\pm 2$  ml
2. Mengambil 1 mata ose biakan murni bakteri *Shigella dysenteriae* dengan ose bulat kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi PZ steril.
3. Menghomogenkan tabung dan membandingkan kekeruhan dengan standart *Mac Farland* yang sudah di buat.
4. Apabila didapat kekeruhan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* yang melebihi standart maka perlu ditambahkan PZ. Begitu juga bila kekeruhan kurang dari standart maka perlu ditambahkan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae*. Dilakukan terus menerus hingga sesuai dengan standart *Mac Farland* 1.
5. Setelah suspensi bakteri distandarkan dengan *Mac Farland* 1 dimana setara dengan jumlah bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/ml. dibuat polulasi  $10^3$  CFU/ml dengan pengenceran menggunakan PZ steril.

### 3.6.1.1.7 Skema Prosedur Pengenceran Suspensi Bakteri $10^3$ CFU / ml



### 3.6.1.1.8 Pencampuran Suspensi Bakteri *Shigella Dysenteriae* dengan Konsentrasi Perasan Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less)

Alat yang digunakan meliputi pipet ukur 1 ml dan tabung reaksi.

Bahan yang digunakan meliputi suspensi bakteri dan perasan daun beluntas.

Langkah kerja :

1. Menyiapkan konsentrasi perasan daun beluntas 100%, 50%, 25%, sampai dengan 1,56%. Masing-masing konsentrasi dalam tabung yang berbeda sebanyak 1 ml konsentrasi perasan. Khusus konsentrasi 100% dimasukkan ke dalam 2 tabung berbeda (A dan B) dengan volume sama 1 ml.
2. Mengambil 120 mata ose suspensi bakteri yang sudah ditera dan setara dengan 1 ml suspensi bakteri ke dalam tabung A konsentrasi 100%. Tujuan hal ini untuk mengetahui kemampuan perasan 100% pada sejumlah bakteri tanpa dipengaruhi perbandingan volume perasan dan suspensi.

3. Mengambil 1 ml suspensi bakteri dengan steril dan masukkan ke dalam tabung (B) yang berisi 1 ml konsentrasi 100% perasan. Homogenkan agar suspensi tercampur sempurna. Melakukan hal yang sama pada konsentrasi 50%, 25% sampai 1,56%. Tujuan hal ini dilakukan agar perbandingan suspensi dan perasan sama yaitu 1 : 1.

#### **3.6.1.1.9 Pembuatan Media**

##### a. Media *Nutrien Agar Plate* (NAP)

1. Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar* (NA)

Membuat NAP 10 plate, @ plate ± 17 ml

Komposisi NA 20 gr per 1 liter →  $20/1000 \text{ gr} \times 170 \text{ ml} = 3,4 \text{ gr}$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
3. Menimbang bahan media *Nutrient Agar* sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquadest 170 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer
6. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
8. Mengukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0.1 N sampai pH nya 7.4

9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
  10. Setelah turun dari autoclave, menuangkan ke dalam plate yang steril sampai rata
  11. Didiamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Sumarsono, 1996 dalam penelitian Meirisa, 2014).
1. Media *Mac Conkey Agar* (MCA)
  2. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
  3. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah bahan media *Mac Conkey Agar* yang dibutuhkan .  
  
Membuat MCA 30 plate, @ plate 17 ml  
  
Komposisi MCA 50 gr per liter  $\rightarrow 50/1000 \text{ gr} \times 510 \text{ ml} = 25,5 \text{ gr}$
  4. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan
  5. Mengukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 510 ml dengan gelas ukur
  6. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer
  7. Memanaskannya diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
  8. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku

9. Mengukur pH nya dengan cara menambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCL 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 6,9 – 7,3
10. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya. Kemudian larutan tersebut disterilisasi bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
11. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata
12. Dituang larutan tadi ke dalam plate. Masing – masing plate  $\pm$  17 ml secara steril dekat dengan api (Sumarsono, 1996 dalam penelitian Meirisa, 2014).

### **3.6.1.2 Pemeriksaan Penelitian**

#### **3.6.1.2.1 Metode Pemeriksaan**

Metode pemeriksaan menggunakan metode penghitungan Angka Lempeng Total (ALT) pada media pada dengan cara strekcing. Hasil dalam pemeriksaan berupa jumlah pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media *Mac Conkey Agar* (MCA).

#### **3.6.1.2.2 Prinsip Pemeriksaan**

Mengamati ada dan tidaknya pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* setelah diberi perlakuan perasan daun beluntas dengan berbagai konsentrasi dan ditanam di media *Mac Conkey Agar* (MCA). Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Daya hambat perasan dapat dipastikan dengan penghitungan bakteri yang tumbuh.

### 3.6.1.2.3 Penanaman pada Media *Mac Conkey Agar* (MCA)

Alat yang digunakan meliputi ose bulat standart dan api spirtus. Bahan yang digunakan meliputi campuran suspense (bakteri dan konsentrasi perasan) dan media *Mac Conkey Agar* (MCA)

Langkah kerja :

1. Mengambil 1 mata ose campuran suspensi dalam perasan dengan ose standart yang telah di steril dengan api spirtus. Melakukan streking di permukaan media MCA. Steril kembali ose dengan api spirtus.

$$\text{Hasil standart ose} = \frac{1 \text{ mata ose}}{12 \text{ mata ose}} \times 1000 \text{ CFU bakteri} = 83 \text{ CFU/1 mata ose}$$

2. Melakukan cara yang sama pada konsentrasi yang lain.
3. Inkubasi pada incubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
4. Mengamati pertumbuhan bakteri.

### 3.6.1.2.4 Penghitungan Jumlah Bakteri

Alat yang digunakan lampu penerangan, table tabulasi dan alat tulis.

Bahan yang digunakan Media MCA yang terdapat pertumbuhan bakteri

Langkah kerja :

1. Mengkondisikan lokasi pencahayaan baik untuk melihat koloni
2. Menghitung jumlah bakteri yang tumbuh
3. Mencatat dalam table tabulasi

## 3.6.2 Analisis Data

### 3.6.2.1 Tabulasi Data

Penentuan konsentrasi perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* setelah

diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C dan diberi perlakuan diperoleh dari hasil perhitungan jumlah bakteri yang tumbuh dalam media *Mac Conkey Agar* (MCA). Hasil perolehan data ditabulasikan dalam table sebagai berikut :

Tabel 3.1 Tabulasi Data Hasil Penelitian Potensi Perasan Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) sebagai Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*.

No	Kode Sampel / pengulangan	Jumlah Koloni Bakteri yang Tumbuh di Media <i>MCA</i> per 1 mata ose pada Konsentrasi...								
		100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,56%	0,78%	0%
1	A <sub>1</sub>									
2	A <sub>2</sub>									
3	A <sub>3</sub>									
Jumlah										
Rata-Rata										
SD										

Keterangan :

A<sub>1</sub> : Pengulangan ke 1

A<sub>2</sub> : Pengulangan ke 2

A<sub>3</sub> : Pengulangan ke 3

### 3.6.2.2 Analisis Data

Untuk mengetahui apakah perasan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*, maka digunakan Analisis of Varians (ANOVA) dengan taraf signifikansi ( $\alpha$ ) 0.05.