

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini menggunakan daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) yang didapat dari Kec. Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) yang diambil dengan memilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau dan tidak ada hama yang menempel pada daun, masih segar dan tidak layu, dari Kec. Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama penelitian ini yaitu ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

Variabel utama kedua dari penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dalam formulasi obat kumur ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi bisa dikategorikan kedalam bermacam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali serta variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah agar dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung hingga diperlukan kualifikasi agar hasil yang didapat tidak tersebar serta dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi gliserin dalam formulasi obat kumur dengan berbagai konsentrasi.

Variabel kendali penelitian ini ialah kemurnian bakteri uji *Streptococcus mutans*, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang dipakai dalam penelitian ini.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat antibakteri yang dapat dilihat dari pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah daun yang sedang (tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua) berwarna hijau dan tidak ada hama yang menempel pada daun, masih segar dan tidak layu didapat dari Kec Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa.

Kedua, serbuk daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah daun yang sedang yang diambil lalu dicuci dengan air mengalir agar kotoran yang menempel hilang, setelah itu dikeringkan menggunakan oven sampai mengering, setelah kering dijadikan serbuk serta ayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, formulasi adalah sediaan obat kumur dari ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Keempat, evaluasi mutu sediaan obat kumur adalah uji organoleptik, uji pH, uji bobot jenis, pengujian viskositas, dan stabilitas sediaan.

Kelima, bakteri uji pada penelitian ini yaitu *Streptococcus mutans* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, uji aktivitas antibakteri ialah uji menggunakan metode difusi. Metode difusi berupa sediaan dalam berbagai formula obat kumur dengan konsentrasi gliserin yaitu 12%, 24%, 30%, 12% dan kontrol positif berupa obat kumur pasaran "X".

Ketujuh, diameter zona hambat merupakan zona bening yang terbentuk disekitar cakram karena terdapat pertumbuhan bakteri uji dihambat oleh sampel uji.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang dipakai meliputi alat-alat gelas, blender, timbangan digital, pH meter, piknometer, pipet tetes, *Rotary Vacum Evaporator*, inkubator, jarum ose, autoklaf, ayakan mesh nomor 40, jangka sorong, waterbath, wadah, pisau, cawan petri, jangka sorong, batang pengaduk, gelas ukur, viskometer ostwald, tabung reaksi, rak rabung, enkas, dan bunsen.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), etanol, gliserin, Na Benzoat, Sakarin, Menthol, media MHA (*Mueller Hinton Agar*), BHI (*Brain-Heart Infusion*), aquadest.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap awal pada penelitian ini adalah determinasi tanaman yang digunakan dalam penelitian yakni tanaman daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Determinasi ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Determinasi dan deskripsi berfungsi untuk menetapkan keberadaan yang berkaitan dengan ciri morfologi baik secara makroskopi tanaman daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap kepustakaan yang dibuktikan di laboratorium.

2. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk simplisia merupakan tahap awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dengan menggunakan simplisia utuh atau simplisia diiris halus yang telah melewati tahap pengeringan dan ditumbuk dengan menggunakan alat yang tidak menimbulkan kerugian atau kehilangan zat senyawa penting, lalu diayak untuk memperoleh serbuk dengan tingkat kehalusan tertentu. Tingkat ehalusan serbuk simplisia yaitu serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus, dan sangat halus.

Pembuatan serbuk daun mimba dibuat dengan cara daun mimba dicucikan bersih menggunakan air mengalir sampai kotoran dan debunya hilang, lalu daun mimba dikeringkan dengan cara dioven sampai kering. Daun mimba yang telah kering diserbukan memakai alat penyerbukan lalu ayak dengan ayakan nomor 40 hingga didapatkan serbuk dauan mimba dengan derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk berfungsi untuk memperluas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari hingga bisa diperluas sampai penyarian berlangsung efektif (DepKes RI, 2017).

2.1 Pengujian kadar air. Uji kadar air berfungsi agar mengetahui persentase kadar air didalam serbuk serta ekstrak. Kadar air dapat ditentukan melalui metode *Sterling Bidwell*. Metode *Sterling Bidwell* dilakukan dengan cara menimbang sampel lalu masukkan kedalam labu didih kemudian tambahkan dengan solvent sebanyak 200 ml (*toluene*, *xylen*), hubungkan labu *sterling bidwell* dengan labu didih

dan kondensor, panaskan labu didih dengan hati-hati selama 15 menit, sehabis sampel mulai menggelembung penyulingan diatur dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes/detik, sampai separuh air tersulingkan, lalu naikan penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 4 tetes/detik. Setelah semua air tersulingkan, bagian dalam pendingin dicuci menggunakan toluen jenuh air. Volume air dibaca setelah pemisahan sempurna antara air dan *toluene*. Hitung kadar air dalam % v/b (Depkes RI, 2017).

2.2. Pengujian susut pengeringan. pengeringan pemeriksaan dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. *Moisture balance* dinyalakan serta dipanaskan selama 10 menit. Alat diatur ulang dengan menekan menu setelah 10 menit dipanaskan, gunakan metode yang akan dipilih. Ditimbang serbuk sebanyak 2 g dalam cawan aluminium dangkal yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 105°C dan telah ditara. Dimasukkan serbuk kedalam wadah sampel didalam *moisture balance* dan diratakan. *Moisture balance* ditutup dan tunggu hingga lampu mati serta catat hasilnya. Dilakukan sebanyak 3x percobaan, kemudian diukur rata-ratanya. Alat ditunggu hingga suhu 30°C dan matikan alat (Depkes RI, 2017).

3. Pembuatan ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Ekstrak dibuat dari serbuk kering simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Gunakan pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. 500 g serbuk kering simplisia dimasukkan kedalam maserator, ditambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil diaduk sesekali, diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. sekurang-kurangnya ulangi proses menyarian satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Semua maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah juga dapat menggunakan "rotavapor" hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh dihitung dengan persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak. (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

4. Penetapan sifat ekstrak

4.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis berfungsi untuk mengetahui bau, warna, serta rasa dari sediaan serbuk dan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

4.2 Penetapan susut pengeringan. Pengeringan pemeriksaan dilakukan menggunakan alat moisture balance. Moisture balance dinyalakan serta dipanaskan selama 10 menit. Alat diatur ulang dengan menekan menu setelah 10 menit dipanaskan, gunakan metode yang akan dipilih. Ditimbang ekstrak kental sebanyak 2 g dalam cawan aluminium dangkal yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 105°C dan telah ditara. Dimasukkan ekstrak kental kedalam wadah sampel didalam *moisture balance* dan diratakan. Moisture balance ditutup dan tunggu hingga lampu mati serta catat hasilnya. Dilakukan sebanyak 3x percobaan, kemudian diukur rata-ratanya. Alat ditunggu hingga suhu 30°C dan matikan alat. (Depkes RI, 2017)

5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak

5.1 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 2 ml larutan uji diuapkan pada cawan porselen, residu dilarutkan dengan 5 ml larutan HCl 2N. Kemudian dididihkan disaring, lalu ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi dragendorff. Hasil positif alkaloid ditunjukkan jika timbul endapan berwarna jingga kecoklatan (Marliana *et al.*, 2005).

5.2 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 1 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan dengan beberapa tetes NaOH 20%. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna kuning (Ugochukwu *et al.*, 2013)

5.3 Identifikasi tanin. Sebanyak 2 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna hitam kehijauan atau hitam (Nirwana *et al.*, 2015).

5.4 Identifikasi Saponin. Sebanyak 5 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi tambahkan 5 ml aquadest panas dan dikocok 30 detik, apabila terbentuk busa selama 10 menit setinggi 1-10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2N, maka teridentifikasi adanya saponin (Marliana *et al.*, 2005).

5.5 Identifikasi Antraquinon. Sebanyak 5 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi tambahkan beberapa tetes natrium hidroksida 1N. Adanya senyawa antraquinon ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah (Nirwana *et al.*, 2015).

5.6 Identifikasi steroid dan terpenoid. Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan . Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 2 ml kloroform, lalu ditambah pereaksi *liebermann-burchard* melalui dinding tabung tersebut. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan/violet pada perbatasan 2 pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid (Jones dan Kinghom, 2006).

6. Formula obat kumur ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.)

Formula yang dipakai mengacu pada penelitian yang sudah dilakukan oleh Maharani *et al.*, (2021) dengan judul penelitian Formulasi *Mouthwash* Ekstrak Kulit Buah Nanas (*Ananas Comosus* (L.) Merr dengan variasi konsentrasi Gliserin sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menunjukkan hasil zona hambat bakteri yang kuat. Kosentrasi ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) yang digunakan mengacu pada penelitian Fitriah (2017).

Tabel 1. Rancangan formula obat kumur ekstrak daun mimba

| Bahan | Formula (% b/v) | | | | Fungsi |
|--------------------|-----------------|------|------|------|-----------|
| | F1 | F2 | F3 | F(-) | |
| Ekstrak daun mimba | 1 | 1 | 1 | 0 | Zat aktif |
| Gliserin | 12 | 24 | 30 | 12 | Humektan |
| Na benzoat | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Pengawet |
| Sakarin | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Pemanis |
| Menthol | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | Aroma |
| <i>Aquadest</i> ad | 100 | 100 | 100 | 100 | Pelarut |

Keterangan :

F 1 : Formula obat kumur dengan gliserin 12

F 2 : Formula obat kumur dengan gliserin 24

F 3 : Formula obat kumur dengan gliserin 30

F- (Kontrol -) : Formula obat kumur dengan gliserin 12

Kontrol + : obat kumur yang ada dipasaran "X"

Standar kelayakan untuk formula obat kumur :

- Membasmi kuman yang menyebabkan gangguan kesehatan pada mulut dan gigi
- Tidak menyebabkan iritasi
- Tidak mengubah indera perasa
- Tidak mengganggu keseimbangan flora mulut
- Tidak meningkatkan resistensi mikroba
- Tidak menimbulkan noda pada gigi (Rachma, 2010).

Target daya hambat dari ekstrak daun mimba adalah sebesar > 5-20 mm (sedang - kuat) (Morales *et al.*, 2003).

7. Pembuatan sediaan obat kumur

Ekstrak daun mimba yang akan diformulasikan kedalam sediaan obat kumur dengan masing-masing konsentrasi disiapkan, yaitu 1% yang dibuat dalam 100 ml aquadest. Pertama yang dilakukan dalam pembuatan sediaan obat kumur menimbang semua bahan yang diperlukan sesuai dengan formulasi yang dibuat, kemudian digerus mentol didalam mortir lalu ditambahkan sedikit etanol hingga larut, dan masukkan berurutan, sakarin, Na benzoate, gliserin dengan variasi konsentrasi 12, 24, 30 dan 12 (kontrol negatif), serta ekstrak daun mimba sebesar 1% pada setiap formulasi yang sudah dilarutkan dahulu kedalam sedikit aquadest dan untuk kontrol negatif tanpa ekstrak daun mimba. Dihomogenkan sampai rata dan tambahkan dengan aquadest yang masih tersisa. Kemudian masukkan kedalam wadah yang bersih untuk diamati. (Handayani *et al.*, 2016)

8. Pengujian mutu fisik sediaan obat kumur

8.1 Pemeriksaan organoleptis. Evaluasi sediaan obat kumur dilakukan dengan mengamati sediaan dari segi bentuk, warna, rasa, dan aroma. Pemeriksaan ini dilakukan pada suhu kamar, berdasarkan standar mutu obat kumur herbal yang baik tidak terjadi perubahan pada organoleptis saat diamati kembali (Putri *et al.*, 2018).

8.2 Pemeriksaan Homogenitas. Pemeriksaan homogenitas diujikan melalui sediaan yang dilihat dibawah cahaya terang agar memastikan semua zat yang ada didalam sediaan obat kumur terlarut dengan baik dan tidak ada partikel yang mengendap pada dasar wadah (Hidayanto *et al.*, 2017).

8.3 Pemeriksaan bobot jenis. Pemeriksaan bobot jenis dilakukan dengan alat piknometer yang sudah dikeringkan dan ditimbang. Didinginkan sampai suhu mencapai 25°C lalu sampel dimasukkan ke dalam piknometer, tutup rapat lalu timbang. Lakukan pemeriksaan pembandingan menggunakan aquadest (Hidayanto *et al.*, 2017).

8.4 Pemeriksaan pH. Uji pH merupakan salah satu bagian dari kriteria pemeriksaan fisika dan kimia dalam memprediksi kesetabilan suatu sediaan obat kumur (Pratama dan Arief, 2018). Nilai pH obat kumur yang dihasilkan harus berdasarkan standar mutu obat kumur herbal yaitu pH antara 5-7 (Suryani *et al.*, 2019). Pemeriksaan ini dilakukan menggunakan pH meter.

8.5 Pemeriksaan viskositas. viskositas bertujuan untuk mengetahui konsistensi atau kekentalan suatu sediaan. Pengujian viskositas sediaan mouthwash yang baik adalah sebesar 1,27-1,82 cP (Handayani *et al.*, 2018).

8.6 Pemeriksaan stabilitas sediaan. Pengujian stabilitas sediaan yaitu melihat kondisi fisik (bau, warna, kejernihan) serta evaluasi pH pada selama proses penyimpanan. Pemeriksaan stabiitas dilakukan dengan menggunakan Metode *cycling test*

9. Identifikasi bakteri

9.1 Identifikasi dengan agar darah. Identifikasi dengan media agar darah bertujuan untuk mengetahui bakteri yang digunakan adalah benar bakteri *Streptococcus mutans*. Suspensi bakteri digores pada permukaan media menggunakan kapas lidi steril. Inkubasi bakteri dalam waktu 24 jam dengan temperatur 37°C. Pengujian bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil positif apabila terbentuk hemolisis alfa (α) disekitar koloni bakteri yang menghasilkan warna kemerahan (Jawetz *et al.*, 2007).

9.2 Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan gram pada bakteri bertujuan untuk mengetahui bakteri bersifat Gram negatif atau positif. Pengujian dimulai dengan mempersiapkan jarum ose, bakteri, *objek glass*, serta bahan lainnya. Sterilkan jarum ose dengan api bunsen hingga membara merah, lalu dianginkan sebentar dekat api supaya tetap aseptis. Bakteri diambil menggunakan ose dan ratakan diatas *objek glass* yang telah dibersihkan menggunakan etanol 70%. Bakteri yang berada diatas permukaan *objek glass* ditetesi dengan 1 tetes aquadest, kemudian dilewat-lewatkan diatas api bunsen. Pewarnaan bakteri dimulai dengan meneteskan gram A (cairan kristal violet didiamkan selama 1 menit, bilas secara pelan-pelan di air mengalir. Tetesi menggunakan gram B (Lugol-iodin) didiamkan selama 1 menit, bilas secara pelan-pelan di air mengalir. Tahap berikutnya tetes menggunakan gram C (alkohol 70%) didiamkan sampai warnanya memudar, lalu tambahkan larutan gram D (larutan safranin), dikeringkan sekitar bakteri yang diwarnai. Lakukan pengamatan dibawah mikroskop, *objek glass* berisi bakteri yang diwarnai ditetes menggunakan larutan imersi terlebih dahulu. Fungsi larutan imersi adalah agar bakteri yang diamati akan terlihat lebih jelas serta menghindar terjadinya indeks bias. Pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 100x. Bakteri Gram

positif terlihat berwarna ungu dan untuk bakteri gram negatif terlihat berwarna merah muda (Jawetz *et al.* 2007).

9.3 Identifikasi dengan uji biokimia. Identifikasi biokimia terdiri dari uji katalase dan koagulase. Pengujian katalase dilakukan dengan cara mempersiapkan tabung reaksi yang sudah diisi media BHI dan ditanami suspensi bakteri kemudian ditambahkan dengan H₂O₂ (hydrogen peroksida) 3%. Pada identifikasi katalase bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil positif apabila terdapat gelembung udara pada tabung reaksi. Pengujian koagulase dilakukan dengan cara 200 µl plasma sitrat dimasukkan kedalam tabung reaksi steril secara aseptis kemudian sebanyak 2-3 ose suspensi bakteri uji dimasukkan kedalam tabung dan dicampurkan. Tabung reaksi selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C, diamati pada 4 jam pertama dan sesudah 18-24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan plasma didasar tabung reaksi (Jawetz *et al.*, 2007).

10. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri dan dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5. Pembuatan suspensi dilakukan dengan menggunakan cara koloni dari biakan murni \pm 2-3 ose dimasukkan pada tabung reaksi yang sudah berisi media BHI 10 ml, Homogenkan suspensi bakteri, lalu inkubasi dengan temperatur 37°C selama 5-8 jam didalam inkubator. Konsetrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk pengujian harus sesuai dengan konsetrasi standar menurut Mc Farland 0,5, jika konsentrasinya lebih dari standar Mc Farland 0.5, maka ditambahkan media Brain Heart Infusion (BHI) hingga sama dengan standar Mc Farland.

11. Pengujian aktivitas bakteri sediaan obat kumur

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram kertas. Teknik ini dilakukan dengan mencelupkan kapas lidi steril kedalam suspensi bakteri kemudian diinokulasikan pada media MHA menggunakan teknik perataan (*Spread Plate Method*). Media didiamkan selama 10 menit dengan suhu kamar agar suspensi biakan berdifusi kedalam media. Cawan petri berisi media yang sudah memadat dan sudah dioleskan suspensi bakteri dibalik untuk dibuat 5 daerah uji yaitu 3 konsentrasi sampel, 1 kontrol positif, 1 kontrol negative. Letakkan 5 cakram kertas masing-masing berukuran \pm 8 mm pada media MHA.

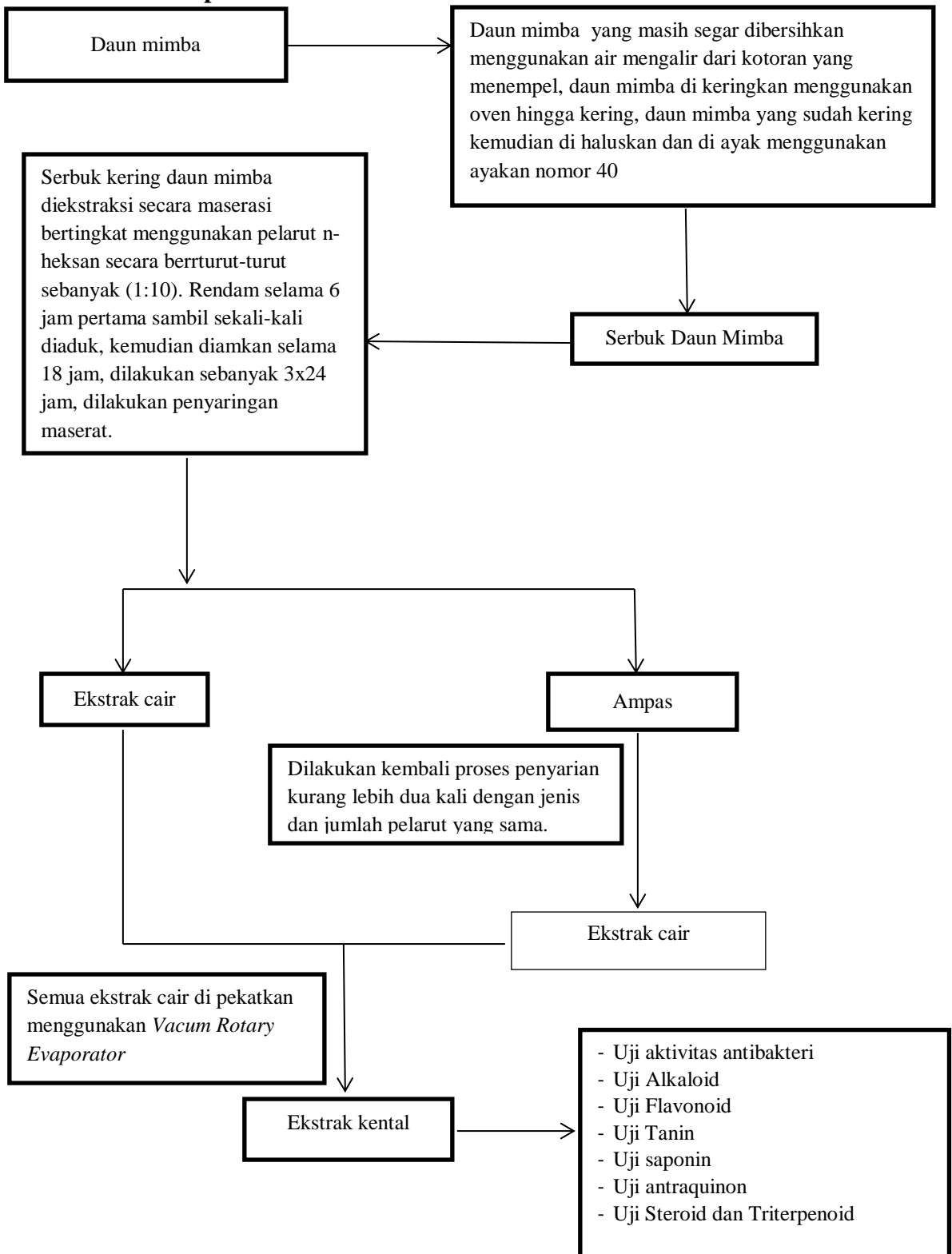
Cakram kertas yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri yaitu terdiri dari 3 cakram kertas yang ditetesi dengan sediaan obat kumur ekstrak daun mimba sebanyak 50 μL menggunakan mikropipet dengan masing-masing konsentrasi formula sediaan sebagai sampel uji. 1 cakram kertas digunakan sebagai kontrol negatif (f4), 1 kertas cakram sebagai kontrol positif menggunakan larutan obat kumur dipasaran “X” dan ekstrak. Inkubasi dalam waktu 18-24 jam temperature 37° C. Setelah inkubasi selesai, amati dan ukur diameter zona bening disekitar kertas cakram memakai jangka sorong 3 sisi. Diameter zona hambat diakui dengan satuan mm (Ditjen POM, 1995).

E. Analisis Hasil

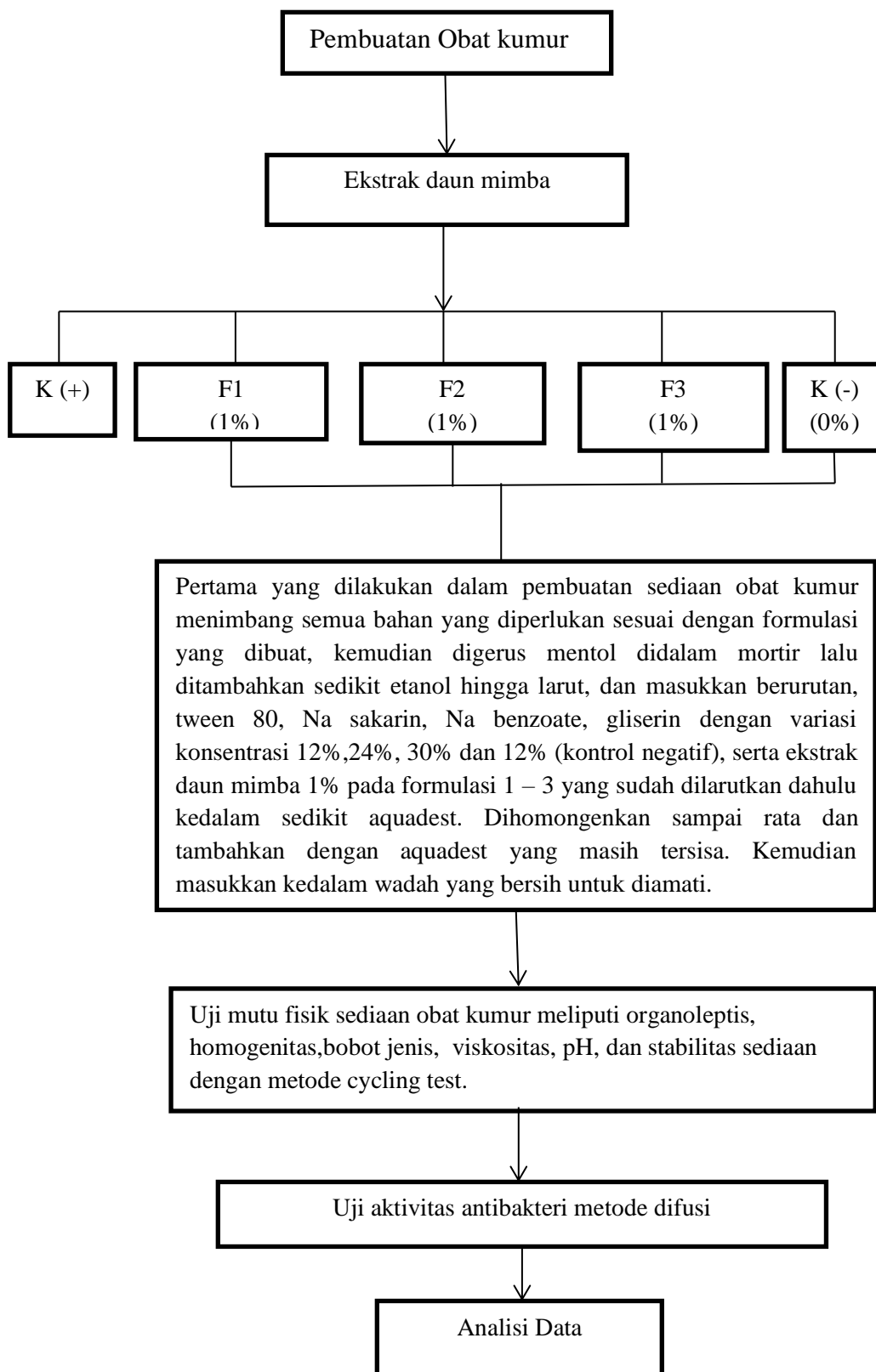
Analisis hasil dari beberapa pengujian parameter yaitu pH, viskositas, dan pengujian difusi dianalisis menggunakan perbandingan hasil yang didapatkan melalui bermacam literatur yang telah diperoleh serta dianalisis menggunakan SPSS. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov*. Hasil yang didapatkan bila terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan menggunakan tahap *analysis of variant* (ANOVA) *One Way* pada analisa statistik stabilitas sediaan agar mengetahui signifikansi stabilitas sediaan tiap formula dengan taraf kepercayaan 95%. Dilanjutkan pengujian *Tukey* agar mengetahui konsentrasi manakah yang mempunyai pengaruh sama ataupun berbeda antar satu dengan yang lainnya. Jika hasil tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka lanjutkan pengujian *Kruskal wallis* agar mengetahui apakah konsentrasi gliserin mempunyai perbedaan signifikan atau tidak.

F. Skema jalannya penelitian

1. Skema pembuatan ekstrak daun mimba



2. Skema pembuatan obat kumur



3. Skema pengujian aktivitas antibakteri metode difusi

