

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO MÀNG POLYMER KHÁNG KHUẨN TRÊN CƠ SỞ TINH DẦU SẢ VÀ CHITOSAN

STUDYING ELABORATION OF ANTIBACTERIAL POLYMER FILMS BASED ON LEMONGRASS ESSENTIAL OIL AND CHITOSAN

Dương Thế Hy*

Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Đà Nẵng, Việt Nam¹

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: dthy@dut.udn.vn

(Nhận bài / Received: 23/3/2023; Sửa bài / Revised: 10/5/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 18/5/2023)

Tóm tắt - Bài báo này nói về việc chế tạo và xác định khả năng kháng khuẩn của màng poly(vinyl alcohol) (PVA) phối hợp tinh dầu sả và chitosan. Hệ phân tán nano chitosan chứa tinh dầu được tạo ra bằng phương pháp gel hóa ion rồi phối trộn với dung dịch PVA trước khi tạo màng bằng phương pháp đúc từ dung dịch. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, mặc dù hàm lượng tinh dầu trong màng lên đến 15% nhưng nếu không có mặt chitosan thì màng không có khả năng kháng khuẩn *E. coli*. Màng chỉ chứa chitosan cũng không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Tuy nhiên, khi có mặt chitosan trong màng thì khả năng kháng khuẩn của màng bắt đầu xuất hiện ở hàm lượng tinh dầu 10% trong màng. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy khi không có mặt chitosan thì tinh dầu hình thành các tập hợp có kích thước lớn trong màng.

Từ khóa - PVA; tinh dầu sả; chitosan; kháng khuẩn

1. Đặt vấn đề

Bao bì nói chung thực hiện 3 chức năng chính: Tạo thuận lợi trong việc phân phối, vận chuyển; tạo sự thu hút của người tiêu dùng đối với mặt hàng bên trong và bảo vệ sản phẩm bên trong khỏi sự tác động của môi trường bên ngoài. Đối với các sản phẩm có nguy cơ bị tấn công bởi vi sinh vật thì vai trò của bao bì trong việc chống lại tác động của vi sinh vật từ môi trường bên ngoài cực kỳ quan trọng. Nếu bao bì thực hiện tốt chức năng kháng khuẩn thì tuổi thọ của sản phẩm sẽ tăng, đồng thời loại và lượng chất bảo quản đưa vào sản phẩm càng ít. Điều đó làm cho sản phẩm càng "sạch" hơn và giá thành có thể giảm. Công nghệ sản xuất bao bì truyền thống tạo ra sản phẩm thụ động trong việc ngăn cản tác động xấu của môi trường lên sản phẩm bên trong. Bao bì hoạt tính là một khái niệm được sử dụng để chỉ các loại bao bì có khả năng kéo dài thời hạn sử dụng, cải thiện độ an toàn của sản phẩm bên trong so với bao bì truyền thống. Đối với sản phẩm thực phẩm, bao bì hoạt tính còn có thể làm tăng cường các đặc tính cảm quan. Bao bì kháng khuẩn là một dạng bao bì hoạt tính có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế vi sinh vật gây bệnh. Các hoạt chất kháng khuẩn có thể được kết hợp với polymer để làm bao bì thay vì trực tiếp được thêm vào sản phẩm cần bảo quản. Với cách này vi khuẩn không thể xâm nhập vào bên trong để gây phá hỏng sản phẩm.

Bao bì làm từ vật liệu polymer mang lại sự tiện lợi rất lớn trong cuộc sống. Chính điều này cùng với giá thành rẻ đã làm cho bao bì polymer được sử dụng quá nhiều. Số

Abstract - This paper reports the preparation and determination of the antibacterial activity of poly(vinyl alcohol) (PVA) films containing lemongrass essential oil and chitosan. The chitosan nanodispersion system containing essential oils was created by ion gelation and mixed with PVA solution before forming the film by solution casting. The research results showed that, without chitosan, the film didn't have antibacterial activity against *E.coli* although the essential oil content in the film was up to 15 wt%. The film containing only chitosan also did not exhibit antibacterial activity. However, when both chitosan and essential oil were introduced in the film, the antibacterial ability of the membrane began to appear at 10 wt% of essential oil content. Microscopic observation showed that without chitosan, essential oils formed large aggregates in the film.

Key words - PVA; lemongrass essential oil; chitosan; antibacterial

lượng sử dụng nhiều, thời gian sử dụng ngắn, việc thu gom tái chế và xử lý chưa được thực hiện tốt cộng với thời gian phân hủy hoàn toàn trong đất phải mất hàng trăm, thậm chí hàng nghìn năm [1], khiến cho vấn đề rác thải bao bì polymer trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng ngày càng nghiêm trọng. Một báo cáo cho thấy, năm 2010 Việt Nam là quốc gia đứng thứ 4 trên thế giới (sau Trung Quốc, Indonesia và Philippines) về lượng rác thải nhựa không được xử lý đúng cách [2]. Một trong những giải pháp để khắc phục tình trạng ô nhiễm rác thải polymer là rút ngắn thời gian phân hủy của chúng bằng cách sử dụng các polymer có khả năng phân hủy sinh học. Poly(vinyl alcohol) là một trong số ít các polymer tổng hợp có thể phân hủy sinh học [3]. Với các ưu điểm không độc, trong suốt, dễ gia công, mềm dẻo, tính chất cơ lý tuyệt vời nên PVA được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực bao bì, kể cả bao bì thực phẩm.

Sả là một loại cây được trồng phổ biến ở Việt Nam. Hiện có khoảng 55 loài sả. Hàm lượng cũng như thành phần tinh dầu thay đổi từ 0,4 - 2,0% tùy theo giống, điều kiện sinh thái và phương pháp chiết xuất [4]. Có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học trong tinh dầu sả, chẳng hạn như citral, isoneral, isogeranial, geraniol, geranyl acetate, citronellal, citronellol, germacrene-D, elemol. Các thành phần này mang lại các tác dụng dược lý khác nhau cho tinh dầu sả, bao gồm các đặc tính kháng nấm, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư và chống oxy hóa [5]. Vì vậy tinh dầu sả đã được khai thác thương mại trong ngành dược

¹ The University of Danang - University of Science and Technology, Danang, Vietnam (Duong The Hy)

phẩm, mỹ phẩm và bảo quản thực phẩm. Các vi sinh vật gram dương nhạy cảm với tinh dầu sả hơn so với các sinh vật gram âm [6].

Chitosan là dẫn xuất của chitin, một polymer sinh học phổ biến, có rất nhiều đặc tính tốt như không độc, tương thích sinh học, phân hủy sinh học và đặc biệt là khả năng kháng khuẩn gram âm [7] và cả gram dương [8]. Vì vậy nó được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y tế, thực phẩm, mỹ phẩm.

Nghiên cứu này nhằm đến mục tiêu là tạo ra màng polymer có khả năng kháng khuẩn bằng cách phối hợp tinh dầu sả và chitosan vào polymer nền là PVA.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất

Tinh dầu sả của Công ty TNHH tinh dầu thiên nhiên Huyền Thoại; PVA ($M_n = 60.000 - 125.000$ g/mol; độ thủy phân >99%) của hãng Himedia; cồn 96 độ của Công ty Cổ phần Hóa dược Việt Nam; NaOH, Natri tripolyphosphate (NTPP), axit axetic của Công ty cổ phần tập đoàn Hóa chất Đức Giang; tween 80 của XiLong. Tất cả hoá chất dùng trực tiếp không xử lý lại.

2.2. Tạo màng polymer chứa tinh dầu sả

Nước cất và PVA được tính toán cho vào cốc thủy tinh. Tiến hành khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút với tốc độ 300 vòng/phút. Sau đó, gia nhiệt từ từ đến 90°C trong vòng 30 phút và tiếp tục khuấy trong 2 giờ 30 phút để tạo thành dung dịch trong suốt. Để dung dịch nguội tự nhiên đến nhiệt độ phòng rồi cho tween 80 vào và khuấy ở tốc độ 200 vòng/phút trong 10 phút (dung dịch A). Dung dịch tinh dầu sả trong cồn 96 độ được chuẩn bị riêng (dung dịch B). Cho từ từ dung dịch B vào dung dịch A đồng thời khuấy ở tốc độ 300 vòng/phút trong 60 phút. Hỗn hợp thu được sau đó được để ổn định trong 2h rồi đổ ra khuôn thủy tinh và sấy ở 40°C trong 24 giờ để tạo màng.

2.3. Tạo màng polymer chứa tinh dầu sả và chitosan

Để tạo màng polymer chứa tinh dầu sả và chitosan thì đầu tiên tạo dung dịch PVA. Sau đó, tạo hệ phân tán tinh dầu sả và chitosan. Cuối cùng, tiến hành phối trộn dung dịch PVA và hệ phân tán tinh dầu sả và chitosan rồi tạo màng bằng phương pháp đúc từ dung dịch. Cụ thể như sau:

Dung dịch PVA (dung dịch A) được chuẩn bị như mô tả trong Mục 2.2. Quy trình tạo hệ phân tán tinh dầu sả và chitosan được tham khảo từ công trình của Zeinab Ahmadi và cộng sự [9] nhưng có một vài thay đổi nhỏ. Cụ thể như sau: Cho axit axetic 1% vào cốc thủy tinh có thanh khuấy từ rồi cho từ từ chitosan vào và tiến hành khuấy với tốc độ 300 vòng/phút cho đến khi chitosan tan hoàn toàn. Lượng chitosan được tính toán sao cho dung dịch thu được có nồng độ chitosan là 0,3% và 0,6%. Dung dịch được để ổn định 12 giờ rồi điều chỉnh pH trong khoảng từ 4,5 - 5 bằng dung dịch NaOH 1M. Lấy 100 ml dung dịch này cho vào một cốc thủy tinh khác, thêm 1 ml Tween 80 vào và khuấy ở tốc độ 200 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, cho thêm 0,5 ml tinh dầu vào dung dịch trên và khuấy với tốc độ 500 vòng/phút trong 60 phút (hỗn hợp C). Chuẩn bị dung dịch NTPP (0,4 g NTPP trong 100 ml nước cất) trong một cốc khác. Nhỏ từ từ dung dịch NTPP vào hỗn hợp C (thể

tích dung dịch NTPP bằng 1/5 thể tích hỗn hợp C) và khuấy tiếp trong 10 phút sau khi nhỏ hết dung dịch NTPP thu được hỗn hợp D.

Cho hỗn hợp D vào dung dịch A kèm theo khuấy trộn với vận tốc 500 vòng/phút trong vòng 20 phút. Hỗn hợp thu được sau đó để ổn định trong 1 giờ rồi đổ ra khuôn thủy tinh và sấy ở 40°C trong 24h để tạo màng.

2.4. Xác định đặc tính

Kích thước hạt trung bình của hệ phân tán chứa tinh dầu và chitosan (hỗn hợp D) được đo trên máy phân tích kích thước hạt SZ-100 của hãng Horiba tại Đại học Nha Trang.

Khả năng kháng khuẩn của các màng được kiểm tra trên vi khuẩn *E. coli* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Màng được đặt trên bề mặt đĩa thạch đã cấy sẵn vi khuẩn. Với tinh dầu nguyên thì dùng giấy lọc thấm ướt tinh dầu rồi đặt lên bề mặt đĩa thạch. Đối với hỗn hợp lỏng thì dùng phương pháp đục lỗ thạch. Các đĩa thạch này đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 35°C, sau 12h kiểm tra bằng ngoại quan.

Hình thái bề mặt màng được quan sát bằng kính hiển vi Olympus CX21 với độ phóng đại 40X.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ các cấu tử đến độ ổn định của hệ phân tán

3.1.1. Hệ phân tán chứa PVA và tinh dầu

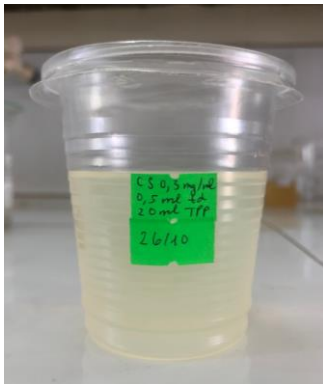
PVA là polymer phân cực, hòa tan trong nước, nhưng tinh dầu không hòa tan vào hệ nước nên để có thể phân tán vào hệ nước thì tinh dầu trước tiên được hòa tan vào cồn 96 độ, sau đó phân tán dung dịch này vào dung dịch PVA với sự hỗ trợ của chất hoạt động bề mặt tween 80. Ảnh hưởng của tỷ lệ chất hoạt động bề mặt/tinh dầu, khối lượng cồn sử dụng đến độ ổn định của hệ phân tán được khảo sát. Kết quả khảo sát (Bảng 1) cho thấy, với hàm lượng tinh dầu trong màng khô là 5% thì tỷ lệ chất hoạt động bề mặt/tinh dầu là 4/3 về khối lượng và hàm lượng cồn trong hỗn hợp cuối cùng dùng để tạo màng là 20% thể tích sẽ thu được hệ phân tán trong suốt và ổn định sau 20 ngày quan sát. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng tinh dầu lên 10%, 15% thì hệ trở nên đục và phân lớp sau 1 đến 2 ngày. Giữ nguyên tỷ lệ chất hoạt động bề mặt/tinh dầu và thay đổi hàm lượng cồn thì thu được kết quả như sau: Với hàm lượng tinh dầu 10% cần 30% thể tích cồn và 15% tinh dầu thì cần 40% thể tích cồn để tạo ra hệ phân tán trong suốt và ổn định.

Bảng 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ các cấu tử đến độ ổn định của hệ phân tán chứa PVA và tinh dầu

Mẫu	% tinh dầu trong màng	Tỷ lệ khối lượng chất nhũ hoá/ tinh dầu	% cồn trong hỗn hợp	Ngoại quan ban đầu	Ngoại quan sau 20 ngày
1	5	2/3	20	Đục	Phân lớp
2	5	3/3	20	Đục	Phân lớp
3	5	4/3	20	Trong	Trong, đồng nhất
4	10	4/3	20	Đục	Phân lớp
5	10	4/3	30	Trong	Trong, đồng nhất
6	15	4/3	30	Đục	Phân lớp
7	15	4/3	40	Trong	Trong, đồng nhất

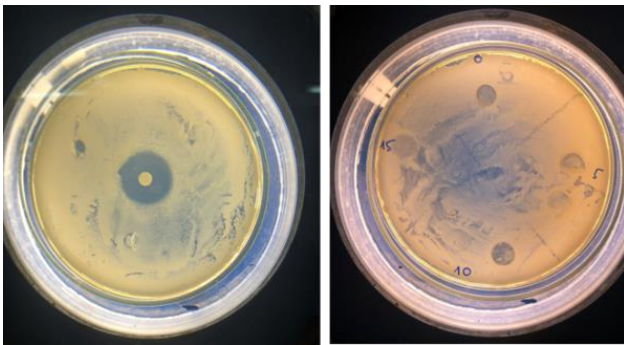
3.1.2. Hệ phân tán chứa tinh dầu và chitosan (hỗn hợp D)

Với quy trình tạo ra hệ phân tán như đã mô tả, Zeinab Ahmadi và cộng sự [9] đã tạo ra được hệ phân tán là các hạt nano chitosan chứa tinh dầu. Kích thước hạt nano thay đổi trong khoảng từ 42nm đến 600 nm khi pH của dung dịch chitosan giảm từ 5,5 xuống 3,5. Trong nghiên cứu này hệ phân tán chứa tinh dầu sả và chitosan (Hình 1) được tạo ra ổn định trong suốt thời gian quan sát (2 tháng). Kích thước hạt trung bình thay đổi theo nồng độ dung dịch chitosan ban đầu. Với dung dịch chitosan có nồng độ 0,3% kích thước hạt trung bình là 309 nm, trong khi đó kích thước hạt trung bình là 821 nm với dung dịch chitosan có nồng độ 0,6%. Sự thay đổi kích thước hạt nano chitosan theo nồng độ dung dịch chitosan ban đầu có thể là do khi cho NTPP vào dung dịch chitosan để gel hóa chitosan thì các phân tử NTPP liên kết với các phân tử chitosan xung quanh nó để tạo gel. Nồng độ dung dịch chitosan tăng lên đồng nghĩa với mật độ của các phân tử chitosan xung quanh phân tử NTPP tăng lên và do đó kích thước hạt nano chitosan tăng lên.



Hình 1. Hệ phân tán tinh dầu và chitosan

3.2. Khả năng kháng khuẩn

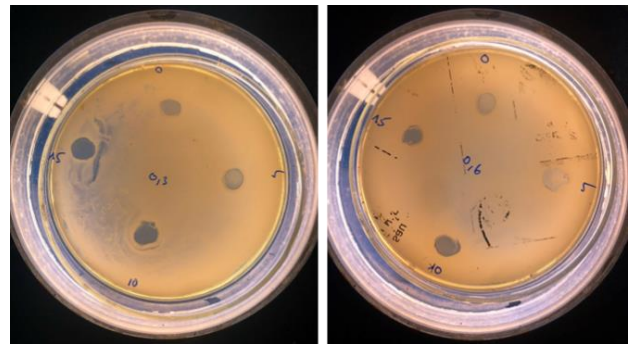


Hình 2. Ảnh chụp kết quả đo khả năng kháng khuẩn của tinh dầu (trái) và màng PVA chứa tinh dầu (phải) sau 12h. Các con số 0, 5, 10 và 15 trên đĩa bên phải tương ứng với hàm lượng tinh dầu tính toán trong màng

Hình 2 cho thấy, tinh dầu nguyên có vòng kháng khuẩn rất rõ, trong khi đó tất cả các màng trên cơ sở PVA và tinh dầu, kể cả màng chứa 15% tinh dầu, đều không có vòng kháng khuẩn, đồng thời ngay vị trí màng tiếp xúc với thạch thì vẫn có vi khuẩn phát triển. Nguyên nhân màng không có hiệu lực kháng khuẩn có thể do tinh dầu bay hơi trong quá trình tạo màng hoặc hàm lượng tinh dầu theo tính toán không đủ để tạo ra hiệu ứng kháng khuẩn. Kết quả kiểm tra kháng khuẩn của hỗn hợp lỏng trước khi tạo màng bằng phương pháp đục lỗ thạch cũng cho thấy

hỗn hợp này không có khả năng kháng khuẩn. Một số nghiên cứu cũng cho thấy, hiệu lực của tinh dầu sả với vi khuẩn *E. coli* thấp [10]–[12].

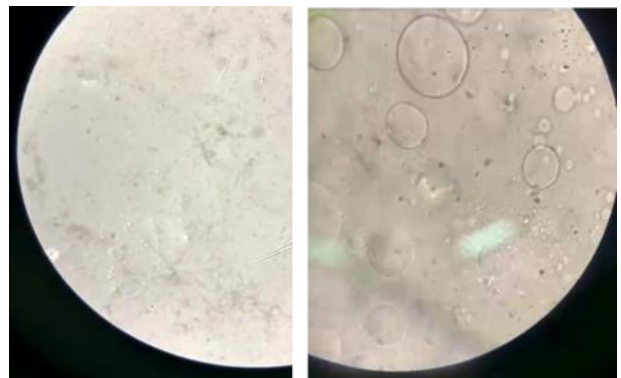
Kết quả cũng tương tự khi trong màng PVA chỉ có chitosan (Hình 3). Có thể dễ dàng nhìn thấy, không có vòng kháng khuẩn và vi khuẩn phát triển ngay bên dưới màng làm cho màng bị mờ. Như vậy, cho dù chitosan trong dung dịch ban đầu với nồng độ 0,3 hay 0,6% thì khi không phối hợp tinh dầu vẫn không có khả năng kháng khuẩn *E.coli*. Kết quả này không giống với kết quả nghiên cứu trước đây [13]. Điều này có thể do mức độ proton hóa chitosan có trong màng thấp [14], cũng có thể do hàm lượng chitosan trong màng chưa đủ cao. Tuy nhiên, phối hợp thêm tinh dầu vào màng thì khả năng kháng khuẩn của màng tăng theo hàm lượng tinh dầu. Với màng chứa 5% tinh dầu khả năng kháng khuẩn không có, nhưng khi hàm lượng tinh dầu 10% và 15% thì mặc dù không thấy rõ vòng kháng khuẩn nhưng không có (hoặc rất ít) vi khuẩn phát triển tại bề mặt thạch tiếp xúc với màng, điều này thể hiện qua bề mặt màng trong chứ không đục.



Hình 3. Ảnh chụp kết quả đo kháng khuẩn của màng PVA chứa chitosan và tinh dầu. Hình bên trái sử dụng màng polymer tạo ra từ dung dịch 0,3% chitosan và bên phải là 0,6% chitosan. Các con số 0, 5, 10 và 15 trên các đĩa là phần trăm tinh dầu tính toán trong màng

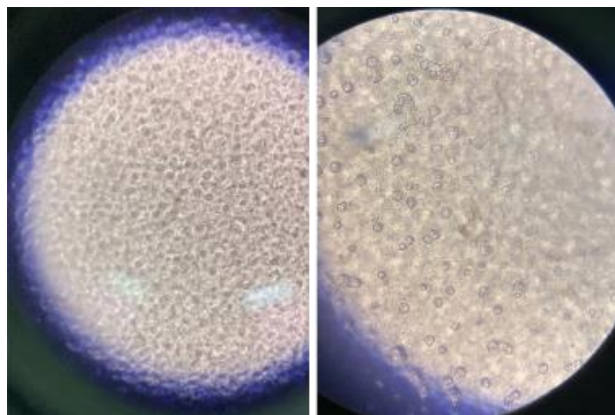
3.2.1. Hình thái bề mặt của màng

Hình 4 thể hiện bề mặt màng PVA và màng PVA chứa 15% tinh dầu. Trong màng, tinh dầu hình thành các tập hợp có kích thước lớn mặc dù hệ phân tán trước khi tạo màng ổn định và trong suốt. Điều này có thể do trong quá trình hình thành màng tỷ lệ nước/ ethanol trong pha lỏng bị thay đổi theo hướng bất lợi cho sự ổn định của hệ phân tán làm xuất hiện sự kết tụ của các tập hợp tinh dầu.



Hình 4. Ảnh chụp kính hiển vi bề mặt màng PVA (trái) và màng PVA chứa 15% tinh dầu (phải)

Với màng chỉ có PVA và chitosan thì tính liên tục của màng rất kém. Khi có mặt tinh dầu thì bề mặt màng liên tục hơn, các tập hợp, có thể là tinh dầu, xuất hiện thưa thớt hơn (Hình 5). Ngoài ra, màng có chứa tinh dầu cho cảm nhận mềm hơn so với màng chỉ chứa chitosan.



Hình 5. Ảnh chụp kính hiển vi bề mặt của màng trên cơ sở PVA phối hợp chitosan (trái) và PVA phối hợp chitosan và 15% tinh dầu (phải)

4. Kết luận

Màng PVA có phối hợp tinh dầu và chitosan đã được tạo ra bằng phương pháp đúc từ dung dịch. Trong quá trình hình thành màng có sự tách pha của tinh dầu và chitosan. Màng PVA chứa đến 15% tinh dầu sả vẫn không thể hiện khả năng kháng khuẩn *E. coli*. Tuy nhiên, khi phối hợp chitosan vào thì hiệu ứng kháng khuẩn *E. coli* của màng xuất hiện.

Lời cảm ơn: Tác giả gửi lời cảm ơn đến cô Nguyễn Thị Minh Nguyệt, khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Đào Thị Huyền Trang, Nguyễn Minh Quang, Trần Hoài Ân, lớp 18H4, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Chamas *et al.*, “Degradation Rates of Plastics in the Environment”, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 9, pp. 3494–3511, 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b06635.
- [2] J. R. Jambeck *et al.*, “Plastic waste inputs from land into the ocean”, *Science*, vol. 347, no. 96223, pp. 768–771, 2015, doi: 10.1126/science.1260352.
- [3] E. Chiellini *et al.*, “Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 28, no. 6, pp. 963–1014, 2003, doi: 10.1016/S0079-6700(02)00149-1.
- [4] T. P. Dao *et al.*, “Evaluation of Physico-Chemical Properties of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) Essential Oil Grown in Tien Giang Province, Vietnam”, *Asia J. Chem.*, vol. 32, no. 5, pp. 1248-1250, 2020, Aug. 2009, doi: 10.14233/ajchem.2020.22258.
- [5] M. Mukarram *et al.*, “Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities”, *Antioxidants*, vol. 11, Art. no. 1, 2022, doi: 10.3390/antiox11010020.
- [6] M. I. Naik *et al.*, “Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria”, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 535–538, 2010, doi: 10.1016/S1995-7645(10)60129-0.
- [7] I. M. Helander *et al.*, “Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 71, no. 2–3, pp. 235–244, 2001, doi: 10.1016/s0168-1605(01)00609-2.
- [8] K. Bae *et al.*, “Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality”, *Clin. Oral Investig.*, vol. 10, no. 2, pp. 102–107, 2006, doi: 10.1007/s00784-006-0038-3.
- [9] Z. Ahmadi *et al.*, “*Achillea millefolium* essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*”, *J. Pest Sci.*, vol. 91, no. 2, pp. 837–848, 2018, doi: 10.1007/s10340-017-0912-6.
- [10] M. Maizura *et al.*, “Antibacterial Activity and Mechanical Properties of Partially Hydrolyzed Sago Starch–Alginate Edible Film Containing Lemongrass Oil”, *J. Food Sci.*, vol. 72, no. 6, pp. C324–C330, 2007, doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00427.x.
- [11] M. A. Rojas-Graü *et al.*, “Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films”, *J. Food Eng.*, vol. 81, no. 3, pp. 634–641, 2007, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.01.007.
- [12] A. Acevedo-Fani *et al.*, “Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties”, *Food Hydrocoll.*, vol. 47, pp. 168–177, 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.032.
- [13] M. Abbas *et al.*, “Chitosan-polyvinyl alcohol membranes with improved antibacterial properties contained *Calotropis procera* extract as a robust wound healing agent”, *Arab. J. Chem.*, vol. 15, no. 5, p. 103766, 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.103766.
- [14] P. Mayachiew *et al.*, “Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract”, *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 125–132, 2010, doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.006.