

# ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BỔ SUNG TINH DẦU LÁ HÚNG QUẾ (*OCIMUM BASILICUM*) VÀO MÔI TRƯỜNG PHA LOÃNG LÊN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG GÀ TRONG BẢO QUẢN LẠNH

Võ Thị Huỳnh Như, Nguyễn Thành Đức Nghĩa, Nguyễn Văn Vui\*

Bộ môn Chăn nuôi Thú y, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

\*Tác giả liên hệ email: nvvuity@tvu.edu.vn

## TÓM TẮT

Stress oxy hoá thường xảy ra và gây hại đến chất lượng của tinh trùng gà trong quá trình bảo quản lạnh. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung tinh dầu húng quế vào môi trường pha loãng lên chất lượng tinh trùng gà trong bảo quản lạnh. Hoạt lực, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng và khả năng bị oxy hóa của tinh trùng được sử dụng để đánh giá chất lượng tinh trùng. Kết quả thí nghiệm cho thấy, nghiệm thức bổ sung tinh dầu húng quế với nồng độ dưới  $15\mu\text{g/ml}$  có khả năng bảo vệ tốt tinh trùng, trong khi đó nghiệm thức ở nồng độ cao hơn sẽ gây hại đến chất lượng tinh trùng khi bảo quản lạnh. Đặc biệt, ở nồng độ  $15\mu\text{g/ml}$ , chất lượng tinh trùng gà trong bảo quản lạnh là tốt nhất và kết quả này có sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ( $P < 0,05$ ). Tóm lại, ảnh hưởng của tinh dầu húng quế lên chất lượng tinh trùng gà trong bảo quản lạnh phụ thuộc vào nồng độ tinh dầu húng quế sử dụng và nồng độ tối ưu là  $15\mu\text{g/ml}$ .

*Từ khóa:* Húng quế, tinh dầu, tinh trùng gà, chất chống oxy hoá.

## Effects of supplementing *Ocimum basilicum* leaf essential oil into semen extender on the chicken sperm quality in cryopreservation

Vo Thi Huynh Nhu, Nguyen Thanh Duc Nghia, Nguyen Van Vui

## SUMMARY

Oxidative stress commonly occurs and detrimentally affects to the quality of chicken sperm during cryopreservation. This study was conducted to assess the impact of adding *Ocimum basilicum* leaf essential oil into the semen extender on the chicken sperm quality in cryopreservation. The parameters, such as: motility, viability, membrane integrity, and lipid peroxidation of sperm were employed to evaluate sperm quality. The experimental results revealed that supplementing *Ocimum basilicum* leaf essential oil into extenders at concentrations below  $15\mu\text{g/ml}$  was effective in sperm quality protection, whereas adding *Ocimum basilicum* leaf essential oil at higher concentrations caused detrimental effect on sperm quality during cryopreservation. Particularly, at a concentration of  $15\mu\text{g/ml}$ , the sperm quality was the best, and this result was statistically significant compared to the control ( $P < 0.05$ ). In summary, the influence of *Ocimum basilicum* leaf oil on the chicken sperm quality in cryopreservation depends on the *Ocimum basilicum* leaf oil concentration, and the optimal concentration is  $15\mu\text{g/ml}$ .

*Keywords:* *Ocimum basilicum*, essential oils, chicken sperm, antioxidants.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giao tinh nhân tạo có vai trò quan trọng trong công tác giống trên gà. Để chuẩn bị tinh trùng gà cho việc giao tinh nhân tạo, tinh trùng gà phải

được pha với môi trường pha loãng và được bảo quản lạnh hoặc trữ đông. Tuy nhiên, phương pháp bảo quản lạnh thì đơn giản và dễ thực hiện hơn phương pháp bảo quản trữ đông. Trong quá trình bảo quản tinh trùng gà sẽ có những thay đổi về

sinh hoá và vật lý, những acid béo chưa bão hoà ở màng tinh trùng và hệ thống kháng oxy hoá nội sinh bị ức chế (Partyka và cs., 2012) gây ra stress oxy hoá (Gharagozloo và cs., 2011) do tiếp xúc với các gốc oxy hoá trong tế bào (ROS) (Nguyen TM và cs., 2015). Điều này làm tăng tính thấm, gây hư hại màng sinh chất, màng acrosome, ty thể, DNA, tinh trùng bất hoạt và chết (Moghbeli và cs., 2016). Do đó, bổ sung chất kháng oxy hoá ngoại sinh vào môi trường pha loãng góp phần làm giảm sự tác động của ROS khi bảo quản và cải thiện chất lượng tinh trùng (Manjunath và cs., 2002). Có nhiều nghiên cứu sử dụng chất kháng oxy hoá có nguồn gốc hoá chất như bổ sung catalase và N-acetyl-L-cysteine (Partyka và cs., 2015); catalase và vitamin E (Moghbeli và cs., 2016) vào môi trường pha loãng có hiệu quả trong bảo quản tinh trùng gà. Thời gian gần đây, với xu hướng nghiên cứu các thành phần kháng oxy hoá của tinh dầu chiết xuất từ thảo dược đang được các nhà khoa học quan tâm và chú ý với mục đích bổ sung vào quá trình bảo quản tinh trùng trên vật nuôi như bổ sung tinh dầu *Ocimum gratissimum* (Nguyễn Văn Vui và cs., 2019); bổ sung chiết xuất nụ đinh hương và hai chất chống oxy hóa từ dầu ô liu (Motlagh và cs., 2014; Arando và cs., 2019) có hiệu quả cải thiện chất lượng tinh trùng trên chó.

Ở Việt Nam, có khoảng hơn 3.200 loài thảo mộc (Võ Văn Chi, 1996). Trong đó, cây húng quế (*Ocimum basilicum*) là dược liệu quý, rất giàu tinh dầu (3,5%) và chứa thành phần kháng oxy hoá như linalool, cineole, và estragole (Trevisan và cs., 2006; Ánh, 2009). Đây là nguồn nguyên liệu tiềm năng bổ sung vào môi trường pha loãng trong bảo quản tinh dịch gà. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá việc bổ sung tinh dầu lá húng quế (*Ocimum basilicum*) vào môi trường pha loãng lên chất lượng tinh trùng gà bảo quản lạnh.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: từ 12/2022 đến 6/2023.

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm thí nghiệm, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh.

### 2.2. Vật liệu

#### 2.2.1. Hoá chất

Tất cả các loại hoá chất sử dụng đều được mua từ Sigma và Merck.

Tinh dầu lá húng quế (*Ocimum basilicum*) được ly trích bằng phương pháp chưng cất hơi nước.

#### 2.2.2. Động vật và thu thập tinh dịch

Các mẫu tinh trùng được lấy từ 10 con gà Nòi lai, 7-10 tháng tuổi, khoẻ mạnh, đã được kiểm chứng về khả năng sinh sản.

Thu thập tinh dịch bằng phương pháp massage (Burrows và Quinn, 1937) với tần suất 2 lần/tuần. Mẫu tinh dịch có các chỉ tiêu chất lượng: >75% hoạt lực (Mortimer, 1994); >400×10<sup>6</sup> tinh trùng/ml; kỳ hình <5% và tỷ lệ sống >90% (Chalah và cs., 1999) thì được sử dụng trong nghiên cứu này.

### 2.3. Nội dung nghiên cứu

Thực hiện ly trích tinh dầu lá húng quế bằng phương pháp chưng cất hơi nước.

Đánh giá ảnh hưởng của tinh dầu lá húng quế lên hoạt lực, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn của màng và khả năng bị oxy hoá của tinh trùng gà bảo quản lạnh.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Ly trích tinh dầu húng quế

Tinh dầu húng quế được ly trích bằng phương pháp chưng cất hơi nước theo phương pháp của Trần Thanh Quỳnh Anh và cs. (2020). Nguyên liệu húng quế tươi được làm héo trong điều kiện tự nhiên sau 2-3 giờ trước khi đem sấy khô bằng tủ sấy ở 40°C trong 60 giờ đến khi khô hoàn toàn. Tiếp tục, đem phần nguyên liệu đã sấy khô cho vào máy nghiền, nghiền nhuyễn thành bột Húng quế. Cân 50g lá húng quế cắt nhỏ và cho thêm 400ml nước cho vào bình cầu 1000ml của hệ

thống chung cất tinh dầu Clevenger, sau đó đun ở nhiệt độ 60°C-70°C, thời gian chung cất trong khoảng từ 1-2 giờ để thu tinh dầu Húng quế. Tinh dầu được tách nước bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và bảo quản ở nhiệt độ 0-4°C trước khi sử dụng. Phân tích thành phần và hàm lượng tương đối các hợp chất dễ bay hơi trong mẫu tinh dầu húng quế bằng phương pháp sắc ký khí - quang phổ khối (GC-MS).

**2.4.2. Hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu húng quế**

Hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu được

xác định bằng phản ứng với 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) theo phương pháp của Blois (1958). Vitamin E được sử dụng như một chất chuẩn kháng oxy hóa.

**2.4.3. Quá trình bảo quản tinh trùng và bố trí thí nghiệm**

Môi trường pha loãng cơ bản Besltsville dùng trong nghiên cứu được mô tả bởi Amini và cs. (2015) và được bổ sung với các nồng độ tinh dầu khác nhau. Thành phần của môi trường được thể hiện qua bảng 1.

**Bảng 1. Môi trường pha loãng tinh trùng gà**

Thành phần	Nghiệm thức						
	ĐC	HQ-1	HQ-2	HQ-3	HQ-4	HQ-5	HQ-6
Kali citrate tribasic monohydrate (g)	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
Natri-L-glutamate (g)	8,67	8,67	8,67	8,67	8,67	8,67	8,67
Magie clorua khan (g)	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
D-(-)-Fructose (g)	5	5	5	5	5	5	5
Kali photphate dibasic trihydrate (g)	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59
Kali photphate monobasic (g)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
N-[Tris(hydroxymethyl) methyl]-2 (g)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Natri axetat trihydrate (g)	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
Kháng sinh Pen-Strep (g)	5	5	5	5	5	5	5
Nước cất (ml)	Đủ 1000	Đủ 1000	Đủ 1000	Đủ 1000	Đủ 1000	Đủ 1000	Đủ 1000
Tinh dầu (mg)*	0	5	10	15	20	25	30

Ghi chú: ĐC: đối chứng; HQ-1, HQ-2, HQ-3, HQ-4, HQ-5, và HQ-6: 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30µg/ml tinh dầu tương ứng, \* tinh dầu chiết xuất từ lá húng quế.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên tái đo lường gồm 7 nghiệm thức với các nồng độ tinh dầu: 0; 5; 10; 15; 20; 25; và 30µg/ml. Thí nghiệm được lặp lại 4 lần và thực hiện tái đo lường trong thời gian 21 ngày (3 ngày/1 lần) với sự tương tác của nghiệm thức và thời gian bảo quản.

Tinh dịch gộp từ 10 con gà được pha loãng với môi trường pha loãng ở tỷ lệ 1:15 để đạt được nồng độ 200x10<sup>6</sup> tinh trùng/ml. Sau khi pha loãng, tinh dịch được hạ lạnh bằng phương pháp thủ công đến 5°C với tốc độ 0,3°C/phút. Mẫu tinh dịch được bảo quản lạnh (5°C) trong 21 ngày.

**2.4.4. Đánh giá hoạt lực tinh trùng**

Theo phương pháp mô tả bởi Đào Đức Thà (2006), dùng pipet lấy một giọt tinh dịch nhỏ lên lam kính đã được làm ấm. Đặt lamen khô, sạch lên giọt tinh dịch sao cho giọt tinh quét đều bốn cạnh của lamen. Tiếp theo, đưa lam kính lên soi dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X. Tiến hành đếm và tính hoạt lực tổng số (HLTS) và hoạt lực tiến thẳng (HLTT).

$$HLTS (\%) = \frac{\Sigma(\text{tinh trùng sống})}{\Sigma(\text{tinh trùng quan sát})} \times 100$$

$$HLTT (\%) = \frac{\Sigma(\text{tinh trùng tiến thẳng})}{\Sigma(\text{tinh trùng quan sát})} \times 100$$

#### 2.4.5. Đánh giá tỷ lệ tinh trùng sống

Sử dụng phương pháp nhuộm Eosin-Nigrosin (Chalah và cs., 1999), nhỏ 5 $\mu$ l dung dịch thuốc nhuộm lên lam kính, tiếp theo nhỏ 5 $\mu$ l mẫu tinh dịch pha loãng cạnh bên giọt thuốc nhuộm và trộn đều, sau đó dàn mẫu trên lam kính, để mẫu khô tự nhiên và quan sát bằng kính hiển vi 40X. Tinh trùng chết bắt màu hồng của thuốc nhuộm. Ngược lại, tinh trùng sống không bắt màu.

$$\text{Tỷ lệ tinh trùng sống (\%)} = \frac{\Sigma(\text{tinh trùng sống})}{\Sigma(\text{tinh trùng quan sát})} \times 100$$

#### 2.4.6. Tính toàn vẹn của màng

Sử dụng phương pháp thử nghiệm độ phồng nhược thâm thấu (HOST: Hypo-Osmotic Swelling Test) theo mô tả của Shahverdi và cs. (2015). Khi ủ trong điều kiện nhược trương, để cân bằng áp suất nước sẽ đi vào bên trong tinh trùng, làm tăng thể tích và màng tinh trùng sẽ căng phồng lên, thay đổi hình thái đuôi. Rút 30 ml tinh dịch loãng (20x10<sup>6</sup> tinh trùng/ml) với 300 ml dung dịch nhược trương 100 mOsm/kg (9 g/L fructose và 4,9 g/L sodium citrate trong nước cất), đem hỗn hợp ủ ở 37°C trong 30 phút. Quan sát dưới kính hiển vi 40X. Ghi nhận ít nhất 200 tinh trùng (đuôi căng phồng; đuôi không căng phồng).

$$\text{Tỷ lệ toàn vẹn màng (\%)} = \frac{\Sigma(\text{tinh trùng trương phồng})}{\Sigma(\text{tinh trùng quan sát})} \times 100$$

#### 2.4.7. Đánh giá khả năng bị oxy hóa

Sử dụng xét nghiệm acid thiobarbituric (TBAR) (Ohkawa và cs., 1979) đo hàm lượng malondialdehyde (MDA). Lấy 0,3ml dung dịch mẫu từng nghiệm thức cho phản ứng với 0,6 ml TBAR (acid tricloaxetic 15% (w/v), acid thiobarbituric 0,375% (w/v) trong acid clohydric 0,25N) ở 90°C trong 15 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 405nm bằng hệ thống quang phổ kế. Hàm lượng MDA (nmol MDA/50x10<sup>6</sup> tinh trùng) của mẫu được tính dựa theo phương trình đường chuẩn MDA.

#### 2.4.8. Phân tích thống kê

Phân tích phương sai tải đo lường để đánh giá sự tương tác giữa nghiệm thức và thời gian bảo quản bằng phần mềm SPSS 22.0. Tukey test được áp dụng để so sánh sự khác nhau giữa các giá trị trung bình của nghiệm thức và thời gian bảo quản. Sự khác nhau giữa các giá trị trung bình có ý nghĩa thống kê khi P<0,05. Kết quả được thể hiện giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân tích tinh dầu húng quế

Ly trích 150g bột húng quế thu được 1,1ml tinh dầu có các đặc điểm cảm quan: màu trong suốt, hơi ánh vàng; mùi thơm dịu nhẹ đặc trưng; vị đắng nhẹ, hơi the. Kết quả phù hợp với tiêu chuẩn đánh giá tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum*) theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 11887:2017.

Phân tích tinh dầu húng quế bao gồm có 29 hoạt chất, một số hoạt chất có tính kháng oxy hoá và kháng khuẩn: estragole, tau-cadinol, trans- $\alpha$ -bergamotene,  $\beta$ -linalool,  $\delta$ -cadinene, và  $\alpha$ -cadinol. Trong đó, estragole (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O) là hoạt chất chính, chủ yếu và chiếm tỷ lệ cao 76,751%, theo dược điển Việt Nam quy định về hàm lượng estragole trong tinh dầu húng quế phải có ít nhất là 60,12%.

Nồng độ ức chế hoạt tính DPPH 50% (IC<sub>50</sub>) dùng để xác định hoạt tính kháng oxy hoá. Nồng độ IC<sub>50</sub> của tinh dầu húng quế và chất chuẩn vitamin E ghi nhận được lần lượt là 1.844  $\mu$ g/ml và 54  $\mu$ g/ml.

#### 3.2. Kết quả hoạt lực tinh trùng

Kết quả về hoạt lực tổng số (HLTS) và hoạt lực tiến thẳng (HLTT) của tinh trùng được trình bày trong bảng 2. Chỉ tiêu HLTS và HLTT của các nghiệm thức có xu hướng giảm dần trong thời gian 21 ngày thí nghiệm, các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu có giá trị hoạt lực cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Hoạt lực tăng dần ở các nghiệm thức bổ sung tinh dầu với nồng độ

**Bảng 2. Ảnh hưởng của việc bổ sung tinh dầu với các nồng độ khác nhau vào môi trường pha loãng đến hoạt lực tinh trùng (%)**

Chỉ tiêu	Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
HLTS (%)	ĐC	93,11±0,07 <sup>IA</sup>	90,10±0,03 <sup>EB</sup>	83,56±0,04 <sup>EC</sup>	81,08±0,04 <sup>ED</sup>	73,05±0,02 <sup>EE</sup>	71,04±0,02 <sup>EF</sup>	65,01±0,04 <sup>EG</sup>	53,97±0,07 <sup>EH</sup>
	HQ-1	94,17±0,04 <sup>IA</sup>	92,43±0,09 <sup>EB</sup>	86,58±0,04 <sup>EC</sup>	83,07±0,05 <sup>ED</sup>	77,03±0,03 <sup>EE</sup>	74,03±0,04 <sup>EF</sup>	71,01±0,03 <sup>EG</sup>	61,95±0,02 <sup>EH</sup>
	HQ-2	93,27±0,06 <sup>IA</sup>	90,14±0,04 <sup>EB</sup>	89,59±0,08 <sup>EC</sup>	85,08±0,08 <sup>ED</sup>	76,03±0,03 <sup>EE</sup>	71,01±0,05 <sup>EF</sup>	69,02±0,01 <sup>EF</sup>	65,99±0,02 <sup>EG</sup>
	HQ-3	97,21±0,01 <sup>IA</sup>	95,08±0,38 <sup>EB</sup>	92,64±0,46 <sup>EC</sup>	91,05±0,70 <sup>ED</sup>	86,08±0,04 <sup>EE</sup>	83,09±0,05 <sup>EF</sup>	77,02±0,02 <sup>EG</sup>	72,10±0,05 <sup>EH</sup>
	HQ-4	96,18±0,07 <sup>IA</sup>	94,25±0,03 <sup>EB</sup>	88,07±0,05 <sup>EC</sup>	84,59±0,06 <sup>ED</sup>	79,06±0,03 <sup>EE</sup>	73,07±0,03 <sup>EF</sup>	71,81±3,58 <sup>EF</sup>	67,98±0,05 <sup>EG</sup>
	HQ-5	94,10±0,02 <sup>IA</sup>	93,13±0,03 <sup>EB</sup>	89,38±0,29 <sup>EC</sup>	85,56±0,03 <sup>ED</sup>	78,06±0,05 <sup>EE</sup>	73,06±0,03 <sup>EF</sup>	68,01±0,04 <sup>EG</sup>	63,46±0,04 <sup>EH</sup>
HLTT (%)	HQ-6	95,61±0,02 <sup>IA</sup>	93,06±0,21 <sup>EB</sup>	88,10±0,06 <sup>EC</sup>	86,11±0,05 <sup>ED</sup>	73,05±0,02 <sup>EE</sup>	71,04±0,02 <sup>EF</sup>	65,01±0,04 <sup>EG</sup>	53,97±0,07 <sup>EH</sup>
	ĐC	76,05±0,03 <sup>EE</sup>	73,01±0,04 <sup>EF</sup>	69,02±0,04 <sup>EG</sup>	60,98±0,02 <sup>EH</sup>	52,05±0,02 <sup>EE</sup>	48,08±0,04 <sup>EF</sup>	37,02±0,05 <sup>EG</sup>	30,99±0,07 <sup>EH</sup>
	HQ-1	85,26±0,04 <sup>EA</sup>	82,49±0,10 <sup>EB</sup>	76,16±0,05 <sup>EC</sup>	72,21±0,04 <sup>ED</sup>	60,16±0,03 <sup>EE</sup>	56,11±0,04 <sup>EF</sup>	47,04±0,06 <sup>EG</sup>	39,05±0,03 <sup>EH</sup>
	HQ-2	84,57±0,11 <sup>EA</sup>	80,75±0,05 <sup>EB</sup>	76,70±0,07 <sup>EC</sup>	73,17±0,10 <sup>ED</sup>	62,13±0,05 <sup>EE</sup>	58,11±0,03 <sup>EF</sup>	54,12±0,06 <sup>EG</sup>	43,06±0,03 <sup>EH</sup>
	HQ-3	92,33±0,02 <sup>EA</sup>	91,16±0,37 <sup>EB</sup>	87,70±0,44 <sup>EC</sup>	86,07±0,65 <sup>ED</sup>	70,16±0,04 <sup>EE</sup>	68,14±0,07 <sup>EF</sup>	65,13±0,05 <sup>EG</sup>	48,04±0,05 <sup>EH</sup>
	HQ-4	85,91±0,74 <sup>EA</sup>	83,40±0,31 <sup>EB</sup>	79,09±0,15 <sup>EC</sup>	75,20±2,03 <sup>ED</sup>	66,33 ±2,35 <sup>EE</sup>	59,54±2,83 <sup>EF</sup>	54,82±0,66 <sup>EG</sup>	43,50±1,10 <sup>EH</sup>
HQ-5	86,67±0,05 <sup>EA</sup>	80,23±0,02 <sup>EB</sup>	79,93±0,27 <sup>EB</sup>	74,67±0,04 <sup>EC</sup>	64,11±0,06 <sup>ED</sup>	59,12±0,05 <sup>EF</sup>	54,10±0,05 <sup>EF</sup>	44,52±0,06 <sup>EG</sup>	
HQ-6	86,66±0,04 <sup>EA</sup>	81,12±0,17 <sup>EB</sup>	75,23±0,03 <sup>EC</sup>	75,22±0,06 <sup>EC</sup>	66,17±0,05 <sup>ED</sup>	59,61±0,08 <sup>EF</sup>	56,11±0,01 <sup>EF</sup>	45,03±0,02 <sup>EG</sup>	

*Ghi chú: ĐC: đối chứng; HQ-1, HQ-2, HQ-3, HQ-4, HQ-5, và HQ-6: 0; 5; 10; 15; 20; 25 và 30µg/ml tinh dầu tương ứng; HLTS: hoạt lực tổng số; HLTT: hoạt lực tiến thẳng. Các giá trị Mean±SD cho 4 lần lặp lại, mỗi lần là một mẫu gộp của 1 lần thu tinh. Các chữ cái viết thường (a, b, c, d, e, f và g) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (P<0,05) và các chữ cái viết hoa (A, B, C, D, E, F, G và H) khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời gian bảo quản (P<0,05).*

thấp (0 đến 15µg/ml) và giảm dần ở các nghiệm thức bổ sung nồng độ cao (15 đến 30µg/ml). Riêng, đối với nghiệm thức HQ-3 (15µg/ml) hoạt lực (HLTS và HLTT) luôn duy trì ở mức cao và khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng (P<0,05).

**3.3. Kết quả tỷ lệ tinh trùng sống**

Kết quả về tỷ lệ tinh trùng sống (%) được thể hiện ở bảng 3. Giá

trị tỷ lệ sống ở các nghiệm thức giảm dần theo thời gian bảo quản (21 ngày), ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu giá trị này cao hơn ở nghiệm thức đối chứng. Tỷ lệ sống tăng dần ở các nghiệm thức bổ sung tinh dầu với nồng độ thấp (từ 0 đến 15µg/ml) và giảm dần ở các nghiệm thức bổ sung tinh dầu với nồng độ cao (từ 15 đến 30µg/ml). Trong đó, nghiệm thức HQ-3 (nồng độ 15µg/ml) có chất lượng tinh trùng tốt nhất, tỷ lệ sống có giá trị cao và khác biệt có

**Bảng 3. Ảnh hưởng của việc bổ sung tinh dầu với các nồng độ khác nhau vào môi trường pha loãng đến tỷ lệ tinh trùng sống (%)**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
ĐC	92,27 ± 0,18 <sup>BA</sup>	85,38 ± 0,19 <sup>BB</sup>	72,15 ± 0,17 <sup>BC</sup>	57,14 ± 0,19 <sup>BD</sup>	44,09 ± 0,22 <sup>BE</sup>	40,05 ± 0,19 <sup>EF</sup>	35,03 ± 0,21 <sup>EG</sup>	26,04 ± 0,27 <sup>EH</sup>
HQ-1	92,50 ± 0,50 <sup>BA</sup>	84,30 ± 0,27 <sup>BB</sup>	72,44 ± 0,60 <sup>BC</sup>	61,41 ± 0,54 <sup>BCD</sup>	55,45 ± 0,60 <sup>BCD</sup>	47,36 ± 0,55 <sup>CF</sup>	43,27 ± 0,59 <sup>BCG</sup>	31,28 ± 0,59 <sup>CH</sup>
HQ-2	93,06 ± 0,33 <sup>BA</sup>	85,07 ± 0,27 <sup>BB</sup>	72,97 ± 0,24 <sup>BC</sup>	59,96 ± 0,27 <sup>BD</sup>	54,77 ± 0,30 <sup>BCDE</sup>	45,66 ± 0,23 <sup>CD</sup>	40,65 ± 0,29 <sup>DE</sup>	29,81 ± 0,34 <sup>EH</sup>
HQ-3	94,27 ± 1,09 <sup>BA</sup>	87,28 ± 0,99 <sup>AB</sup>	84,24 ± 1,05 <sup>BC</sup>	75,27 ± 1,00 <sup>BD</sup>	71,23 ± 1,00 <sup>BE</sup>	67,22 ± 1,03 <sup>BF</sup>	60,67 ± 1,42 <sup>AG</sup>	49,63 ± 1,46 <sup>AI</sup>
HQ-4	93,35 ± 0,39 <sup>BA</sup>	84,35 ± 0,36 <sup>BB</sup>	71,26 ± 0,43 <sup>BC</sup>	61,27 ± 0,37 <sup>BD</sup>	45,45 ± 0,28 <sup>BE</sup>	46,94 ± 0,40 <sup>CF</sup>	41,88 ± 0,45 <sup>CDG</sup>	31,66 ± 0,38 <sup>CH</sup>
HQ-5	93,42 ± 1,17 <sup>BA</sup>	84,41 ± 1,14 <sup>BB</sup>	72,41 ± 1,19 <sup>BC</sup>	63,38 ± 1,16 <sup>BD</sup>	56,78 ± 1,21 <sup>BE</sup>	50,75 ± 1,11 <sup>BF</sup>	44,72 ± 1,16 <sup>BG</sup>	33,75 ± 1,11 <sup>BH</sup>
HQ-6	93,07 ± 1,22 <sup>BA</sup>	83,97 ± 1,24 <sup>BB</sup>	67,93 ± 1,37 <sup>BC</sup>	60,67 ± 1,31 <sup>CD</sup>	52,90 ± 1,29 <sup>DE</sup>	44,92 ± 1,32 <sup>DF</sup>	40,09 ± 0,20 <sup>DG</sup>	30,79 ± 1,22 <sup>CH</sup>

*Ghi chú: ĐC: đối chứng; HQ-1, HQ-2, HQ-3, HQ-4, HQ-5, và HQ-6: 0; 5; 10; 15; 20; 25 và 30µg/ml tinh dầu tương ứng. Các giá trị Mean±SD cho 4 lần lặp lại, mỗi lần là một mẫu gộp của 1 lần thu tinh. Các chữ cái viết thường (a, b, c, d và e) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (P<0,05) và các chữ cái viết hoa (A, B, C, D, E, F, G và H) khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời gian bảo quản (P<0,05).*

ý nghĩa (P<0,05) với nghiệm thức đối chứng (71,23±1,00% so với 44,09±1,00% ở ngày 12, 67,22±1,03% so với 40,05±0,19% ở ngày 15, 60,67±1,42% so với 35,03±0,21% ở ngày 18, 49,63±1,46% so với 26,04±0,27% ở ngày 21) và với các nghiệm thức còn lại.

**3.4. Kết quả tính toán vện của màng**

Kết quả ghi nhận về tính toàn vẹn của màng (%) được thể hiện ở bảng 4. Ở tất cả các nghiệm thức giá trị này giảm dần theo thời gian bảo quản 21 ngày, nhưng ở nghiệm thức đối chứng giá trị này thấp hơn ở các nghiệm thức còn lại. Từ ngày 3 đến ngày 6, chỉ tiêu này tăng dần ở các nghiệm thức bổ sung tinh dầu nồng độ thấp (0 và 5µg/ml) và giảm dần ở các nghiệm thức bổ sung nồng độ cao (từ 10 đến 30µg/ml). Ngược lại, từ ngày 9 đến ngày 21 chỉ tiêu này giảm ở các nghiệm thức bổ sung với nồng độ thấp (0 và 5µg/ml) và tăng ở các nghiệm thức có nồng độ tinh dầu cao (từ 10 đến 30µg/ml). Đặc biệt, ở nghiệm thức HQ-3 (15µg/ml) kể từ ngày 6 đến ngày 21 thông số này luôn có giá trị cao nhất và khác biệt rõ rệt khi so với nghiệm thức đối

chứng: 69,79±1,28% so với 46,16±0,89% ở ngày 12, 65,76±1,26% so với 42,11±0,78% ở ngày 15, 58,70±1,25% so với 37,09±0,80% ở ngày 18, 47,66±1,20% so với 27,99±0,85% ở ngày 21.

**3.5. Kết quả khả năng bị oxy hóa của tinh trùng**

Kết quả ghi nhận ở bảng 5 về khả năng bị oxy hóa (nồng độ MDA) của tinh trùng. Nhìn chung, nồng độ MDA ở các nghiệm thức tăng dần theo thời gian thí nghiệm (21 ngày) và sự khác biệt này rõ rệt, có ý nghĩa (P<0,05), giá trị này ở nghiệm thức có bổ sung tinh dầu thấp hơn ở nghiệm thức đối chứng. Ở ngày 1, giá trị nồng độ MDA cao ở 02 nghiệm thức HQ-1 (5µg/ml) và HQ-2 (10µg/ml), thấp ở các nghiệm thức còn lại. Từ ngày 3 đến ngày 21 nồng độ MDA giảm dần ở các nghiệm thức có nồng độ tinh dầu thấp (từ 0 đến 10µg/ml) và tăng dần ở các nghiệm thức có nồng độ cao (từ 15 đến 30µg/ml), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (P<0,05). Tuy nhiên, trong thời gian 21 ngày thực hiện thí nghiệm nồng độ MDA ở nghiệm thức HQ-3 (15µg/ml) luôn thấp và khác biệt có ý nghĩa (P<0,05) so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức còn lại.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của tinh dầu húng quế lên tính toàn vẹn của màng tinh trùng (%)**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
ĐC	94,25 ± 0,82 <sup>A</sup>	86,78 ± 0,58 <sup>abcB</sup>	74,21 ± 0,89 <sup>BC</sup>	59,15 ± 0,83 <sup>cdD</sup>	46,16 ± 0,89 <sup>dE</sup>	42,11 ± 0,78 <sup>fF</sup>	37,09 ± 0,80 <sup>gG</sup>	27,99 ± 0,85 <sup>hH</sup>
HQ-1	91,82 ± 1,27 <sup>A</sup>	85,91 ± 0,96 <sup>abB</sup>	71,68 ± 1,25 <sup>bC</sup>	60,67 ± 1,23 <sup>bcdD</sup>	54,64 ± 1,30 <sup>bDE</sup>	46,60 ± 1,19 <sup>cdF</sup>	42,66 ± 1,24 <sup>bcG</sup>	30,50 ± 1,28 <sup>bH</sup>
HQ-2	92,31 ± 0,87 <sup>A</sup>	84,18 ± 0,89 <sup>bceB</sup>	72,21 ± 0,85 <sup>bC</sup>	59,14 ± 0,89 <sup>cdD</sup>	53,86 ± 0,90 <sup>bDE</sup>	44,87 ± 0,88 <sup>cdF</sup>	39,86 ± 0,94 <sup>cG</sup>	29,02 ± 0,84 <sup>cH</sup>
HQ-3	92,81 ± 1,27 <sup>A</sup>	85,78 ± 1,26 <sup>bCB</sup>	82,84 ± 1,26 <sup>aC</sup>	73,78 ± 1,23 <sup>aD</sup>	69,79 ± 1,28 <sup>aE</sup>	65,76 ± 1,26 <sup>aF</sup>	58,70 ± 1,25 <sup>aG</sup>	47,66 ± 1,20 <sup>aH</sup>
HQ-4	93,34 ± 0,52 <sup>A</sup>	84,32 ± 0,57 <sup>bdB</sup>	71,28 ± 0,62 <sup>cC</sup>	61,24 ± 0,55 <sup>bcdD</sup>	45,39 ± 0,45 <sup>dE</sup>	46,95 ± 0,51 <sup>cdF</sup>	41,87 ± 0,55 <sup>bcG</sup>	31,65 ± 0,54 <sup>bH</sup>
HQ-5	92,20 ± 1,26 <sup>A</sup>	83,17 ± 1,21 <sup>deB</sup>	71,17 ± 1,32 <sup>cC</sup>	62,11 ± 1,25 <sup>bdD</sup>	55,62 ± 1,27 <sup>bE</sup>	49,62 ± 1,28 <sup>bF</sup>	43,51 ± 1,30 <sup>bG</sup>	32,53 ± 1,29 <sup>bH</sup>
HQ-6	92,35 ± 1,00 <sup>A</sup>	83,36 ± 0,92 <sup>deB</sup>	67,27 ± 1,01 <sup>BC</sup>	59,97 ± 0,93 <sup>bcdD</sup>	52,33 ± 0,95 <sup>cE</sup>	44,23 ± 1,01 <sup>deF</sup>	42,11 ± 0,86 <sup>bcG</sup>	30,18 ± 1,03 <sup>bH</sup>

Ghi chú: ĐC: đối chứng; HQ-1, HQ-2, HQ-3, HQ-4, HQ-5, và HQ-6: 0; 5; 10; 15; 20; 25 và 30µg/ml tinh dầu tương ứng. Các giá trị Mean±SD cho 4 lần lặp lại, mỗi lần là một mẫu gộp của 1 lần thu tinh. Các chữ cái viết thường (a, b, c, d và e) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (P<0,05) và các chữ cái viết hoa (A, B, C, D, E, F, G và H) khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời gian bảo quản (P<0,05).

**Bảng 5. Khả năng bị oxy hóa của tinh trùng (nmol MDA/50x10<sup>6</sup> tinh trùng)**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
ĐC	15,17 ± 2,10 <sup>GH</sup>	31,02 ± 1,25 <sup>gG</sup>	97,18 ± 1,27 <sup>aF</sup>	123,25 ± 1,25 <sup>gE</sup>	156,99 ± 1,25 <sup>adD</sup>	181,73 ± 1,25 <sup>acC</sup>	222,21 ± 1,25 <sup>abB</sup>	278,40 ± 1,25 <sup>aA</sup>
HQ-1	20,88 ± 1,25 <sup>aH</sup>	29,99 ± 1,25 <sup>abG</sup>	88,62 ± 1,25 <sup>bF</sup>	112,58 ± 1,25 <sup>gE</sup>	154,10 ± 1,25 <sup>adD</sup>	174,76 ± 1,25 <sup>bcC</sup>	209,43 ± 1,25 <sup>baB</sup>	269,43 ± 1,25 <sup>baA</sup>
HQ-2	19,76 ± 1,25 <sup>abH</sup>	28,73 ± 1,25 <sup>abCG</sup>	86,21 ± 1,25 <sup>bF</sup>	105,73 ± 1,25 <sup>gE</sup>	148,06 ± 1,25 <sup>bdD</sup>	169,06 ± 1,25 <sup>ccC</sup>	199,65 ± 1,25 <sup>cbB</sup>	262,58 ± 1,25 <sup>caA</sup>
HQ-3	14,65 ± 1,25 <sup>SH</sup>	22,14 ± 1,25 <sup>dG</sup>	46,39 ± 1,25 <sup>efF</sup>	87,76 ± 1,25 <sup>dE</sup>	112,65 ± 1,25 <sup>adD</sup>	120,73 ± 1,25 <sup>cC</sup>	161,43 ± 1,25 <sup>ebB</sup>	233,36 ± 1,25 <sup>baA</sup>
HQ-4	17,43 ± 1,25 <sup>bGH</sup>	26,14 ± 1,25 <sup>bCG</sup>	80,17 ± 1,25 <sup>gF</sup>	111,28 ± 1,25 <sup>gE</sup>	139,36 ± 1,25 <sup>cdD</sup>	159,21 ± 1,25 <sup>ecC</sup>	193,56 ± 1,25 <sup>dbB</sup>	255,32 ± 1,25 <sup>baA</sup>
HQ-5	15,69 ± 1,25 <sup>SH</sup>	28,06 ± 1,25 <sup>abCG</sup>	64,88 ± 1,25 <sup>dfF</sup>	105,88 ± 1,25 <sup>gE</sup>	131,99 ± 1,25 <sup>bdD</sup>	163,88 ± 1,25 <sup>cdC</sup>	192,43 ± 1,25 <sup>dbB</sup>	242,99 ± 1,25 <sup>aA</sup>
HQ-6	16,51 ± 1,25 <sup>bGH</sup>	26,95 ± 1,25 <sup>bCG</sup>	67,25 ± 1,25 <sup>dfF</sup>	112,65 ± 1,25 <sup>gE</sup>	131,47 ± 1,25 <sup>bdD</sup>	167,76 ± 1,25 <sup>ccC</sup>	202,02 ± 1,25 <sup>cbB</sup>	247,14 ± 1,25 <sup>baA</sup>

Ghi chú: ĐC: đối chứng; HQ-1, HQ-2, HQ-3, HQ-4, HQ-5, và HQ-6: 0; 5; 10; 15; 20; 25 và 30µg/ml tinh dầu tương ứng. Các giá trị Mean±SD cho 4 lần lặp lại, mỗi lần là một mẫu gộp của 1 lần thu tinh. Các chữ cái viết thường (a, b, c, d, e và f) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (P<0,05) và các chữ cái viết hoa (A, B, C, D, E, F, G và H) khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời gian bảo quản (P<0,05).

Màng tinh trùng dễ bị tổn thương khi bảo quản lạnh do khi nhiệt độ giảm thì stress oxy hoá sẽ diễn ra, tác động lên các nhóm metylen, phospholipid của màng sinh chất (Cerolini và cs., 2006). Ngoài ra, một lượng lớn acid béo không bão hòa ở màng tinh trùng rất dễ bị peroxy hóa lipid trong điều kiện nhiệt độ bảo quản lạnh 5°C (Partyka và cs., 2012). Mặc dù, về bản chất tinh trùng gà có hệ thống kháng oxy hoá nội sinh nhưng lượng của chúng không đủ và hoạt động bị ức chế bởi nhiệt độ bảo quản (Feyzi và cs., 2018). Cung cấp chất kháng oxy hóa ngoại sinh là điều quan trọng (Amini và cs., 2015), chúng kết hợp và ngăn chặn gốc tự do phản ứng với tế bào; ức chế các enzym oxy hoá, hạn chế sự oxy hoá lipid bằng việc phản ứng với các gốc lipid, peroxy và chuyển đổi chúng thành các chất ổn định hơn, bảo vệ tốt màng tế bào, cải thiện chất lượng của tinh trùng (Moghbeli và cs., 2016).

Bổ sung tinh dầu húng quế vào môi trường pha loãng khi bảo quản đã ghi nhận được kết quả khả quan về chất lượng tinh trùng. Tuy nhiên, cần chú trọng đến nồng độ tinh dầu bổ sung: ở nồng độ thấp <15µg/ml thì không đủ lượng kháng oxy hoá để trung hoà các gốc tự do, làm tăng ROS trong tinh dịch, giá trị nồng độ MDA tăng làm cho tinh trùng dễ bị tổn thương; khi bổ sung với nồng độ cao >15µg/ml thì bên cạnh tính kháng oxy hoá các hoạt chất còn có tính kháng khuẩn sẽ gây hại đến màng tinh trùng, xảy ra sự phân cực cao, phá vỡ các liên kết đôi phospholipid của màng làm thay đổi về cấu trúc màng, tăng tính thấm, gây rối loạn trao đổi chất, các chất từ bên ngoài xâm nhập vào bên trong làm cho tinh trùng bất hoạt, làm tăng nồng độ MDA.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi bổ sung tinh dầu húng quế với nồng độ tối ưu là 15µg/ml vào môi trường pha loãng trong quá trình bảo quản lạnh, chất lượng tinh trùng được cải thiện rõ rệt. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó về bổ sung kháng oxy hoá ngoại sinh có nguồn gốc từ thảo dược và từ hóa chất: bổ sung tinh dầu dương kỳ thảo (Thananurak và cs., 2020); bổ sung chiết xuất oliu (Seyed và cs., 2016), bổ sung flavonoid quercetin (Tang và cs., 2021) đã mang lại hiệu quả tốt trong bảo quản tinh trùng gà.

## IV KẾT LUẬN

Kết quả thu được từ thí nghiệm bổ sung tinh dầu lá húng quế (*Ocimum basilicum*) vào môi trường pha loãng cơ bản Belstville với nhiều nồng độ khác nhau, cho thấy rằng nồng độ bổ sung tối ưu 15µg/ml đã mang lại hiệu quả tích cực cho hoạt lực tinh trùng, bảo vệ tính toàn vẹn của màng, tăng tỷ lệ sống và giảm khả năng peroxy hoá lipid của màng tinh trùng. Tiếp tục nghiên cứu đánh giá tỷ lệ phối đầu thai và thực hiện phương pháp bảo quản trữ đông trên gà và các vật nuôi khác.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amini Mahmood Reza , Hamid Kohram, Ahmad Zare Shahaneh, Mahdi Zhandi, Hossein Sharideh, & Mohammad Mehdi Nabi, 2015. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*, 70(3):226-232.
2. Arando, A., Delgado, J. V., Fernández-Prior, A., León, J. M., Bermúdez-Oria, A., Nogales, S., & Pérez-Marín, C. C., 2019. Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*, 86:33-39.
3. Ánh H T, 2009. Nghiên cứu bước đầu khả năng kháng khuẩn của các loại tinh dầu li trích từ cây Húng quế (*Ocimum basilicum* L) và cây Húng cây (*Mentha arvensis* L). *Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM*.
4. Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199-1200.
5. Burrows W., Quinn J., 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16:19-24.
6. Chalah, F. Seigneurin, E. Blesbois, & J. Brillard, 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39:185-191.
7. Cerolini S, L Zaniboni, A Maldjian, & T Gliozzi, 2006. Effect of docosahexaenoic acid and  $\alpha$ -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66:877 – 886.

8. Đào Đức Thà, 2006. *Kỹ thuật thụ tinh nhân tạo*, Nxb Lao động – Xã hội.
9. Feyzi S & M. Sharafi, 2018. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. *Poultry Science*, 97(7):2582-2590.
10. Gharagozloo P, & Aitken RJ, 2011. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, 26:1628-40.
11. Manjunath Puttaswamy & Isabelle Thérien, 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, 53 (1-2):109 – 119.
12. Mortimer D, 1994. Semen analysis Practical laboratory andrology. *New York: Oxford University Press*, 68:43-87.
13. Motlagh, M.K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., and Zeinoaldini, S., 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*. Elsevier Inc., 69(2): 217–222.
14. Moghbeli Morteza, Hamid Kohram, Ahmaad Zare-Shahaneh, Mahdi Zhandi, Mohsen Sharafi, Mohammad Mehdi Nabi, Vahid Zahedi, & Hossein Sharideh, 2016. Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration?. *Cryobiology*, 72(3):264-268.
15. Nguyen Van Vui, Samorn P, Sajeera K, Pakanit K, 2019. Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. *Veterinary Medicine and Science*, 5:345–360.
16. Nguyen TM, Seigneurin F, Froment P, Combarnous Y, & Blesbois E, 2015. The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. *PLoS one*, 10:0134420.
17. Ohkawa H., N. Ohishi, & K. Yagi, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2):351-358.
18. Partyka Agnieszka, Ewa Łukaszewicz, & Wojciech Nizański, 2012. Effect of cryo-preservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77:1497 – 1504.
19. Tang M, Cao J, Yu Z, Liu H, Yang F, Huang S, 2021. New semen freezing method for chicken and drake using dimethylacetamide as the cryoprotectant. *Poultry Science*, 100(8):101091.
20. Thananurak P, Chuaychu-Noo N, Thelie A, Phasuk Y, Vongpralub T, & Blesbois E, 2019. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose. *Poultry Science*, 98(9):4161–71.
21. Trevisan Maria Teresa Salles, Maria Goretti Vaasconcelos Silva, Beate Pfundstein, Bertold Spoegelhalder & Robert Wyn Owen, 2006. Characterization of the Volatile Pattern and Antioxidant Capacity of Essential Oils from Different Species of the Genus *Ocimum*. *Agricultural and Food Chemistry*, 54 (12):4378 – 4382.
22. Trần Thanh Quỳnh Anh, Đỗ Thị Bích Thủy, Võ Thị Thu Hằng & Nguyễn Thị Vân Anh, 2020. Các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình tách chiết, khả năng kháng oxi hoá và kháng khuẩn của tinh dầu cây húng quế (*Ocimum basilicum* L.) ở Thừa Thiên Huế, Viện Công nghệ sinh học. *Trường Đại học Huế*.
23. Shahverdi A., Sharafi M., H. Gourabi, A.A. Yekta, V. Esmaeili, M. Sharbatoghli, E. Janzamin, M. Hajnasrollahi, & F. Mostafayi, 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, 83:78-85.
24. Seyed Moones-alali-Kheli Kohi, Mehrdad Mohammadi, & Mohammad Roostaei-Ali Mehr, 2016. Effect of olive extract on rooster semen storage. *Animal Production*, 18(2):377-385.
25. Võ Văn Chi, 2012. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nxb Y học, 1159- 1160.

Ngày nhận: 25-8-2023

Ngày phản biện: 28-8-2023

Ngày đăng: 1-1-2024