

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

*Nguyễn Lưu Trọng Nghĩa, Huỳnh Thanh Tân, Thạch Thị Thanh Ngân,  
Nguyễn Thị Thúy Nhi, Võ Trần Phương Uyên, Nguyễn Thị Tố Quyên,  
Bùi Thanh Phong, Nguyễn Minh Luân, Trương Văn Hiếu, 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**

Trong bảo quản lạnh, tinh trùng chó phải đối mặt với một vấn đề lớn gây suy giảm chất lượng tinh trùng, đó là quá trình tinh trùng bị oxy hóa. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá những ảnh hưởng của tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum*) được bổ sung vào môi trường pha loãng lên chất lượng tinh trùng chó bảo quản lạnh trong 12 ngày. Chất lượng tinh trùng được đánh giá thông qua kiểm tra các chỉ tiêu hoạt lực tiến thẳng, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn của màng tinh trùng và khả năng bị oxy hóa. Kết quả nghiên cứu cho thấy chất lượng tinh trùng giảm dần theo thời gian từ ngày 1 đến ngày 12. Bổ sung tinh dầu húng quế ở nồng độ 20 $\mu$ g/ml đã cho hiệu quả tối ưu nhất về chất lượng tinh trùng theo các tiêu chí đánh giá như trên. Tuy nhiên nếu bổ sung tinh dầu húng quế với nồng độ cao hơn 25 $\mu$ g/ml thì có ảnh hưởng làm giảm chất lượng tinh trùng khi bảo quản lạnh. Kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh rằng tinh dầu húng quế (*Ocimum basilicum*) có ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng, phụ thuộc vào nồng độ tinh dầu bổ sung vào môi trường bảo quản tinh và nồng độ 20 $\mu$ g/ml là nồng độ tối ưu nhất giúp cải thiện chất lượng tinh trùng chó khi bảo quản lạnh.

*Từ khóa:* Tinh trùng chó, tinh dầu húng quế, chất lượng tinh trùng, bảo quản lạnh.

### **Effects of *Ocimum basilicum* essential oil as a supplement in semen extender on canine sperm quality in cryopreservation**

*Nguyen Luu Trong Nghia, Huynh Thanh Tan, Thach Thi Thanh Ngan,  
Nguyen Thi Thuy Nhi, Vo Tran Phuong Uyen, Nguyen Thi To Quyen,  
Bui Thanh Phong, Nguyen Minh Luan, Truong Van Hieu, Nguyen Van Vui*

### **SUMMARY**

During the time of cryopreservation for canine sperm, a major problem is how to reduce the decrease of sperm quality due to the process of sperm oxidation. This study was conducted to evaluate the effects of *Ocimum basilicum* essential oil supplementation in semen extender on the quality of canine sperm during 12 days of cryopreservation. The quality of sperm was assessed through evaluating sperm progressive motility, viability, integrity of the sperm membrane, and lipid peroxidation. The studied results showed that sperm quality gradually decreased over time from day 1 to day 12. Supplementing *Ocimum basilicum* essential oil at a concentration of 20 $\mu$ g/ml gave the most optimal effect on dog sperm quality according to the above evaluation criterias. However, if adding essential oil at a concentration higher than 25 $\mu$ g/ml, it would have an effect on reducing sperm quality in cryopreservation. The results of this study demonstrated that essential oil (*Ocimum basilicum*) has an effect on sperm quality depending on the concentration of added essential oil in semen extenders and the concentration of 20 $\mu$ g/ml is the most optimal concentration to help improve dog sperm quality in cryopreservation.

*Keywords:* Canine sperm, *Ocimum basilicum* essential oil, sperm quality, cryopreservation.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật lấy tinh, pha loãng tinh, bảo quản lạnh lâu dài và thụ tinh nhân tạo ngày càng được quan tâm và đóng vai trò thiết yếu trong công tác nhân giống chó, nhằm tạo ra các giống chó có đặc tính tốt và phù hợp với nhu cầu của con người. Thụ tinh nhân tạo khắc phục tốt các nhược điểm của phối trực tiếp và có các ưu điểm vượt trội như con đực giống được khai thác tinh ở mức độ hợp lý, không làm suy giảm số lượng cũng như chất lượng tinh trùng, sự tiện lợi do không cần vận chuyển chó đực và mất thời gian cho con cái làm quen. Tuy nhiên, hạn chế chính trong bảo quản lạnh tinh trùng là chất lượng tinh trùng giảm vì nhiều nguyên nhân, trong đó có thể kể đến là stress oxy hóa. Màng sinh chất của tinh trùng chứa nhiều acid béo không bão hòa nên chúng dễ bị oxy hóa khi có mặt các gốc oxy phản ứng (Reactive Oxygen Species – ROS) (Vieira *et al.*, 2018). Do đó, nhiều chất chống oxy hóa tổng hợp hóa học khác nhau đã được thử nghiệm bảo quản tinh trùng chó nhằm khắc phục hiện tượng này (Thiangtum *et al.*, 2009). Các chất chống oxy hóa phổ biến nhất được sử dụng để bảo quản lạnh tinh trùng như vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol/Trolox), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), acid ascorbic (vitamin C), quercetin và melatonin (Moradi *et al.*, 2020). Ngoài ra, vi khuẩn thường được phát hiện ngay cả trong tinh dịch, do đó sử dụng chất chống oxy hóa kết hợp với kháng sinh để ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật trong môi trường bảo quản tinh trùng đã được sử dụng (Bresciani *et al.*, 2014). Trong những năm gần đây, các chiết xuất từ thực vật đã được các nhà khoa học quan tâm và chúng được xem như một chất thay thế an toàn để bảo quản và duy trì chất lượng tinh trùng. Một số loài thực vật là nguồn chất chống oxy hóa mạnh mẽ, “thu gom” các gốc tự do để giảm bớt tác động có hại của stress oxy hóa đối với tinh trùng. Hơn thế nữa, các hợp chất tự nhiên này còn có đặc tính kháng khuẩn và làm tăng hoạt động của một số enzyme chống oxy hóa (Nguyen Van Vui *et al.*, 2020). Qua đó cho thấy sử dụng các chiết xuất thực vật là

lựa chọn thay thế tối ưu giúp bảo vệ tinh trùng chống lại sự oxy hóa và các vi sinh vật không mong muốn.

Tại Việt Nam, húng quế (*Ocimum basilicum*) là một loại cây thảo, bụi nhỏ, sống quanh năm không theo mùa, cao từ 0,5-1,2m, phân nhánh nhiều, toàn cây có mùi thơm, lượng tinh dầu cao (0,5-1,7%) và được trồng nhiều nơi ở nước ta (Đỗ Huy Bích, 2006). Trong tinh dầu có chứa hợp chất chống oxy hóa như linalool, cineole, bergamotene, eugenol, estragole (methylchavicol),  $\gamma$ -cadineno, muurol, ermacrene, d tau-cadinol, và  $\gamma$ -gurjunen (Silva *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, tinh dầu húng quế còn ức chế các vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* (Mandal *et al.*, 2012). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của tinh dầu húng quế lên chất lượng tinh trùng chó bảo quản lạnh.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

Thời gian thực hiện: từ tháng 12 năm 2022 đến tháng 6 năm 2023.

Địa điểm thực hiện: Trung tâm Thí nghiệm, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh.

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

Thu thập lá húng quế (*Ocimum basilicum*) ở giai đoạn đang ra hoa lúc 4 tháng tuổi, tại vùng nguyên liệu rau xanh huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang vào tháng 11-12/2022. Sau đó mang về phòng thí nghiệm tại Trường Đại học Trà Vinh tiến hành thí nghiệm.

Chọn 10 con chó đực khỏe mạnh, từ 2-5 năm tuổi, giống Pug có chức năng sinh sản tốt và đều được huấn luyện lấy tinh. Chó được chăm sóc nuôi dưỡng tại trại chó giống Thanh Phong, thành phố Trà Vinh.

### 2.3. Hóa chất và dụng cụ

Dụng cụ: pipet các loại, thiết bị chung cất lôi cuốn hơi nước, bể điều nhiệt, máy ly tâm lạnh, máy hàn đầu tinh cọng rạ, bình đựng nitơ lỏng, dụng cụ thu nhận tinh dịch, bộ dụng cụ pha môi trường, thiết bị làm lạnh tinh.

Hóa chất: glycerol, dung dịch DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), methanol, vitamin E (Sigma-Aldrich), Tris, fructose, citric acid, nigrosin-eosin (Sigma-Aldrich), cồn, nước cất, DMSO (dimethyl sulfoxide), acid thiobarbituric, malondialdehyde, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kháng sinh penicillin và streptomycin (Bio-Pharmachemie).

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Ly trích và phân tích thành phần tinh dầu

Theo phương pháp lôi cuốn hơi nước để ly trích tinh dầu húng quế của Võ Thị Thanh Tuyền và cs. (2020) có điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện thực tế, quy trình như sau: chuẩn bị 15 kg cây húng quế (thân, lá, hoa), sấy ở 40°C trong vòng 60 giờ đạt trọng lượng không đổi. Lấy húng quế sấy khô mang đi nghiền thành bột mịn. Cân 150g bột húng quế với 1.300ml nước

cát rời cho vào bình cầu 1.000ml của hệ thống chung cất tinh dầu Clevenger. Hỗn hợp được gia nhiệt bằng bếp điện ở 70°C cho đến khi thể tích tinh dầu không đổi thì dừng (khoảng 2 giờ). Thu được tinh dầu húng quế là chất lỏng màu vàng nhạt, nhẹ hơn nước và có mùi thơm. Tinh dầu sau khi chiết xuất được đem làm khan bằng muối Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, bảo quản ở nhiệt độ 4°C và sử dụng phương pháp sắc ký khí – quang phổ khối (GC-MS) để phân tích thành phần.

#### 2.4.2. Xác định hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng thử nghiệm DPPH thông qua việc làm giảm màu của gốc tự do DPPH và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 517nm (Sharma và Bhat, 2009). Phản ứng bao gồm 100µl tinh dầu húng quế tan trong methanol ở nồng độ từ 100-800µg/ml, sau đó thêm vào 100µl DPPH (0,2mM) trong đĩa 96 giếng tương ứng. Vitamin E được sử dụng làm đối chứng dương và methanol được dùng như đối chứng âm. Ủ hỗn hợp phản ứng 30 phút trong bóng tối và đọc kết quả ở bước sóng 517nm bằng hệ thống quang phổ kế. Phần trăm hoạt tính chống oxy hóa (AA%) được xác định theo công thức sau (Mensor *et al.*, 2001):

$$AA\% = 100 - \frac{OD \text{ mẫu nghiệm thức} - OD \text{ mẫu đối chứng dương}}{OD \text{ mẫu đối chứng âm}} \times 100$$

Từ đó xây dựng phương trình tương quan tuyến tính và xác định giá trị IC<sub>50</sub> (Half-maximal inhibitory concentration) là nồng độ của tinh dầu khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị IC<sub>50</sub> càng thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH càng cao.

#### 2.4.3. Quá trình bảo quản lạnh và bố trí thí nghiệm

Sau khi thu thập, tinh trùng từ 10 con chó được gộp lại với nhau rồi tách thành 7 ống vô trùng như nhau. Tiến hành ly tâm để loại bỏ tinh thanh (720×g trong 5 phút) (Rijsselaere *et al.*, 2002). Tinh trùng sẽ được pha loãng vào môi trường cơ bản gồm dung dịch đệm Tris và lòng đỏ trứng (20%) (Nguyen Van Vui *et al.*, 2020) và bổ sung 2 loại kháng sinh streptomycin

(100mg), penicillin (60mg) với các nồng độ tinh dầu húng quế 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30µg/ml. Mật độ tinh trùng sau khi pha loãng đảm bảo số lượng tinh trùng là 10<sup>8</sup> tinh trùng/ml. Trước khi tinh dầu được thêm vào môi trường sẽ được pha với DMSO, sau đó hòa tan tất cả vào nước cất vô trùng vừa đủ 100ml. Dung dịch tinh trùng đã pha được làm lạnh từ từ (0,3°C/phút) đến 5°C (Bouchard *et al.*, 1990) bằng phương pháp thử công và bảo quản ở 5°C trong 12 ngày.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 7 nghiệm thức và tái đo lường trong 12 ngày bảo quản. Chất lượng tinh trùng bao gồm các chỉ tiêu hoạt lực tiến thẳng, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn của màng tinh trùng và khả năng bị oxy hóa được đánh giá 3 ngày/lần trong 12 ngày.

#### 2.4.4. Đánh giá hoạt lực tinh trùng tiến thẳng

Theo phương pháp của Chemineau và Caynie (1991) có bổ sung và sửa đổi, nhỏ một giọt khoảng 5 $\mu$ l tinh trùng lên phiến kính và soi dưới kính hiển vi (vật kính 40). Đếm số tinh trùng di chuyển tiến thẳng và không di chuyển hoặc di chuyển tại chỗ để tính tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng (hoạt lực tiến thẳng) trên một vi trường. Đánh giá 200 vi trường.

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

Theo phương pháp của Tamuli và Watson (1994), tinh trùng sống và chết được xác định bằng cách nhuộm eosin-nigrosin. Nhỏ 5 $\mu$ l dung dịch thuốc nhuộm eosin-nigrosin lên lam kính, tiếp đó nhỏ 5 $\mu$ l tinh trùng cạnh bên giọt thuốc nhuộm và dùng tăm được cắt bỏ phần nhọn trộn đều tinh dịch, khuấy đều theo chiều kim đồng hồ khoảng 30 giây và sau đó dàn đều hỗn hợp trên lam kính. Sau khi dàn đều, đợi mẫu khô tự nhiên ngoài không khí và quan sát bằng kính hiển vi với độ phóng đại 100x. Tinh trùng chết là có màng sinh chất cho phép sự xâm nhập của thuốc nhuộm eosin-nigrosin đi vào và bắt màu thuốc nhuộm khi đó tinh trùng sẽ có màu hồng. Ngược lại, tinh trùng có màng sinh chất không có sự xâm nhập của thuốc nhuộm eosin-nigrosin đi vào, tinh trùng vẫn giữ nguyên màu trắng vốn có thì là tinh trùng còn sống. Tối thiểu 200 tinh trùng được đánh giá.

#### 2.4.6. Đánh giá tính toàn vẹn của màng sinh chất tinh trùng

Thử nghiệm độ phòng nhược thẩm thấu (HOST) được sử dụng để đánh giá tính toàn vẹn màng sinh chất của tinh trùng sau khi trữ đông và rã đông (Shahverdi *et al.*, 2015). HOST dựa vào khả năng chống căng phòng của màng tinh trùng trong điều kiện môi trường nhược thẩm thấu. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách cho 10 $\mu$ l dung dịch tinh trùng vào 100 $\mu$ l dung dịch nhược thẩm thấu (150mosM). Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, nhỏ 0,2ml hỗn hợp lên lam kính và xem dưới kính hiển vi với

độ phóng đại 400x. Tổng số 200 tinh trùng (đuôi căng phòng và không căng phòng) sẽ được đánh giá.

#### 2.4.7. Đánh giá khả năng bị oxy hóa của tinh trùng

Sử dụng xét nghiệm acid thiobarbituric (TBA) theo phương pháp được mô tả bởi Buege và Aust (1978) và được cải tiến bởi Maia *et al.* (2010). Quá trình peroxy hóa lipid của tinh trùng được xác định bằng cách đo nồng độ malondialdehyde (MDA). Nồng độ MDA của mỗi mẫu được đo ngay sau khi gây peroxy hóa lipid tinh trùng bằng FeSO<sub>4</sub> 0,24mM ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, 1ml thuốc thử TBA (acid tricloaxetic 15% (w/v), acid thiobarbituric 0,375% (w/v) trong acid clohydric 0,25N) được thêm vào 0,5ml dung dịch mẫu tinh trùng. Hỗn hợp được đun sôi trong bể điều nhiệt 15 phút. Sau khi làm nguội, dung dịch được ly tâm ở 1000xg trong 10 phút. Phần dung dịch được tách ra và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 535nm bằng hệ thống quang phổ kế. Nồng độ MDA được xác định bằng cách so sánh độ hấp thụ của mẫu ở bước sóng 535nm với đường cong chuẩn MDA. Kết quả được thể hiện ở nồng độ MDA nmol/50x10<sup>6</sup> tinh trùng.

#### 2.4.8. Phân tích thống kê

Số liệu thô của các mẫu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và phân tích phương sai kết hợp hai nhân tố được sử dụng để đánh giá sự tương tác giữa hai nhân tố 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 các nhân tố (nghiệm thức, thời gian). 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 ly trích, thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của tinh dầu húng quế

Từ 15kg húng quế tươi được sấy ở 40°C trong khoảng 60 giờ sẽ đạt trọng lượng không đổi và thu được 1.321,88g húng quế khô với vật chất khô tương ứng là 91,18%. Ly trích tinh dầu bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước cho kết quả từ 150g bột húng quế

khô thu được 1,1ml tinh dầu đạt hiệu suất 0,64%; kết quả cho thấy hiệu suất ly trích tinh dầu tương đương với nghiên cứu của Thien Hien Tran *et al.* (2018) và phù hợp với Đỗ Tất Lợi (2015) cho rằng cây húng quế chứa 0,4 - 0,8% tinh dầu.

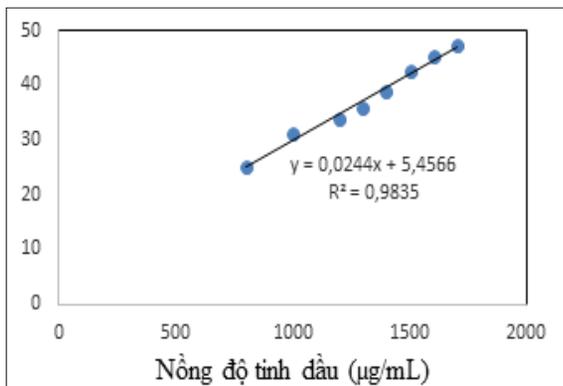
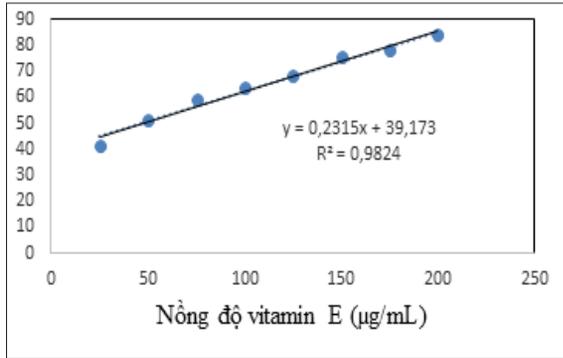
**Bảng 1. Kết quả phân tích thành phần tinh dầu húng quế bằng phương pháp sắc ký khí – quang phổ khối (GC-MS)**

TT	Rt	Tên chất	Hàm lượng (%)
1	12,726	Eucalyptol	0,537
2	13,898	cis- $\beta$ -Ocimene	0,394
3	17,101	$\beta$ -Linalool	4,341
4	17,689	Fenchol	0,776
5	19,346	Camphor	0,848
6	20,461	Borneol	0,227
7	21,699	$\alpha$ -Terpineol	0,433
8	22,24	Estragole	76,751
9	22,972	Fenchyl acetate	0,381
10	25,467	Bornyl acetate	0,36
11	28,949	$\beta$ -Elemene	1,109
12	29,324	Methyl eugenol	1,309
13	29,765	$\beta$ -Caryophyllene	0,219
14	30,24	trans- $\alpha$ -Bergamotene	2,391
15	30,326	$\alpha$ -Guaiene	0,261
16	30,761	Humulene	0,503
17	31,029	cis-Muurola-4(15),5-diene	0,334
18	31,521	Germacrene D	0,412
19	31,601	Không xác định	0,294
20	31,916	Bicyclogermacrene	0,599
21	32,134	$\delta$ -Guaiene	0,582
22	32,326	$\gamma$ -Cadinene	1,609
23	32,522	$\delta$ -Cadinene	0,315
24	33,333	Nerolidol	0,131
25	33,685	Spathulenol	0,165
26	34,384	Epicubenol	0,551
27	34,83	tau-Cadinol	3,836
28	35,012	$\beta$ -Eudesmol	0,17
29	35,057	$\alpha$ -Cadinol	0,162

Kết quả thành phần hoạt chất trong tinh dầu húng quế được thể hiện qua bảng 1. Bảng 1 cho thấy kết quả sau khi phân tích được 99,706%

thành phần của tinh dầu húng quế thì trong đó có chứa nhiều hợp chất có tính kháng oxy hóa cao bảo vệ màng tế bào, bao gồm các hoạt chất

nhu: estragole,  $\beta$ -Linalool, tau-Cadinol, trans- $\alpha$ -bergamotene,  $\beta$ -elemene, methyl eugenol, camphor, và eucalyptol. Bên cạnh đó một số hoạt chất còn có khả năng kháng khuẩn. Kết quả này cũng tương đương với nghiên cứu của Thien Hien Tran *et al.* (2018) và Võ Thị Thanh Tuyền và cs. (2020).



Khả năng chống oxy hóa là một trong các

đặc tính sinh học quan trọng có vai trò ngăn chặn quá trình peroxy hóa lipid – nguyên nhân dẫn đến nhiều sự thoái hóa tế bào (Jayasinghe *et al.*, 2003). Từ phương trình đường biểu diễn (hình 1 và 2), khả năng kháng oxy hóa của tinh dầu và chất chuẩn vitamin E được xác định thông qua khả năng ức chế 50% gốc tự do DPPH. Giá trị  $IC_{50}$  của tinh dầu húng quế được xác định là 1,83mg/ml cao hơn 39 lần so với giá trị  $IC_{50}$  của vitamin E là 0,047 mg/ml. Qua đó cho thấy, tinh dầu húng quế là 1 hợp chất tự nhiên có khả năng trung hòa các gốc tự do DPPH. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy rằng tinh dầu húng quế Ai Cập có  $IC_{50}$  ở nồng độ 0,21mg/ml (Farouk *et al.*, 2016); húng quế Indonesia là 0,142mg/ml (Haerani *et al.*, 2019) và húng quế Việt Nam là 4,13mg/ml (Nguyễn Hoàng Anh và cs., 2022). Sự chênh lệch các giá trị  $IC_{50}$  của tinh dầu húng quế giữa các nghiên cứu có thể là do khác biệt về điều kiện địa lý, thành phần đất đai và khí hậu, giai đoạn lá, thời gian thu hoạch, và phương pháp tách chiết khác nhau dẫn đến hàm lượng và hoạt tính có sự thay đổi (Forouzandeh *et al.*, 2012). Bên cạnh đó, tinh dầu húng quế có khả năng kháng oxy hóa là do chúng chứa nhiều phenolic và flavonoid, các hợp chất này được biết đến như chất chống oxy hóa mạnh mẽ, góp phần thu gom gốc tự do (Cook và Samman, 1996).

**3.2. Kết quả đánh giá hiệu quả bảo quản lạnh trong chổ có bổ sung tinh dầu húng quế**

**Bảng 2. Ảnh hưởng của các mức độ tinh dầu húng quế lên hoạt lực tiến thẳng trung bình của tinh trùng (%) bảo quản lạnh**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12
H0	93,42±0,68 <sup>aA</sup>	82,69±1,18 <sup>cdB</sup>	65,85±2,20 <sup>bc</sup>	51,61±1,86 <sup>cd</sup>	22,27±1,89 <sup>cdE</sup>
H5	93,75±1,60 <sup>aA</sup>	84,75±1,46 <sup>bcB</sup>	66,36±1,92 <sup>bc</sup>	52,11±1,94 <sup>cd</sup>	22,12±1,66 <sup>cdE</sup>
H10	94,10±1,58 <sup>aA</sup>	86,11±1,10 <sup>bB</sup>	68,55±1,77 <sup>abc</sup>	53,78±2,57 <sup>bcd</sup>	24,18±2,65 <sup>bcdE</sup>
H15	94,59±1,30 <sup>aA</sup>	86,65±1,34 <sup>abB</sup>	70,12±0,46 <sup>abc</sup>	55,43±2,53 <sup>bcd</sup>	27,92±4,83 <sup>bcE</sup>
H20	95,32±0,85 <sup>aA</sup>	89,31±0,59 <sup>aB</sup>	74,50±0,91 <sup>aC</sup>	61,34±0,76 <sup>aD</sup>	40,11±0,53 <sup>aE</sup>
H25	92,21±2,30 <sup>abA</sup>	82,96±0,87 <sup>cB</sup>	69,24±4,17 <sup>abC</sup>	57,95±0,18 <sup>abD</sup>	30,46±4,43 <sup>bE</sup>
H30	88,81±3,31 <sup>bA</sup>	71,23±1,00 <sup>dB</sup>	48,74±5,47 <sup>cC</sup>	25,55±2,08 <sup>dD</sup>	19,38±0,42 <sup>dE</sup>

Ghi chú: H0, H5, H10, H15, H20, H25 và H30 là các nghiệm thức tương ứng với nồng độ tinh dầu húng quế là 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30µg/ml. Giá trị là trung bình ± độ lệch chuẩn cho 4 lần lặp lại. Các chữ mũ A, B, C, D và E khác biệt trong cùng 1 hàng thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Các chữ mũ a, b, c và d khác biệt trong cùng 1 cột thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Kết quả bảng 2 cho thấy tỷ lệ phần trăm hoạt lực tiến thẳng trung bình của tinh trùng chó trong 12 ngày bảo quản lạnh tỷ lệ thuận với nồng độ tinh dầu ngày càng tăng. Chỉ số này có xu hướng giảm dần từ ngày 1 đến ngày 12. Tuy nhiên, ở nghiệm thức H25 và H30 thì tỷ lệ phần trăm hoạt lực tiến thẳng trung bình lại giảm thấp hơn nghiệm thức H20. Cụ thể, nồng độ tinh dầu từ 0-25 $\mu\text{g/ml}$  thì tăng dần và cao nhất tại nghiệm thức H20 (20 $\mu\text{g/ml}$ ) với 61,34 $\pm$ 0,76% tinh trùng có hoạt lực tiến thẳng ở ngày 9 và 40,11 $\pm$ 0,53% ở ngày 12. Đặc biệt là nghiệm thức H30 có tỷ lệ phần trăm hoạt lực trung bình tiến thẳng thấp nhất khác biệt so với các nghiệm thức còn lại ( $P<0,05$ ).

Hoạt lực của tinh trùng là một trong những yếu tố quyết định tinh trùng gặp trứng, hoạt lực càng mạnh thì khả năng thụ thai càng cao (Sanocka và Kurpysz, 2004). ROS ở mức sinh lý có vai trò quan trọng với chức năng duy trì khả năng sống sót và di chuyển của tinh trùng. Chìa khóa trong kỹ thuật bảo quản tinh trùng là duy

trì trạng thái cân bằng giữa quá trình oxy hóa và chất chống oxy hóa của tinh trùng bên ngoài lâu nhất có thể. Trong quá trình bảo quản lạnh, ROS dư thừa gây phá vỡ tính toàn vẹn màng tinh trùng, giảm khả năng di chuyển và khả năng sức sống của tinh trùng. Tuy nhiên, các ROS có thể dễ dàng bị hạn chế bởi các hợp chất có tính kháng oxy hóa. Tinh dầu *Ocimum baciliium* có tính kháng oxy hóa mạnh bởi chúng có chứa hàm lượng lớn phenolics và flavonoid (Silva *et al.*, 2015). Do đó, có khả năng trung hòa DPPH, oxit nitric, anion superoxide, gốc hydroxyl và hydro peroxide, cũng như ức chế peroxy hóa lipid; trong đó hydro peroxide và gốc hydroxyl là những ROS có hại nhất đối với tinh trùng (Kaurinovic *et al.*, 2011). Nhờ vậy, tinh trùng được bảo vệ trong quá trình bảo quản lạnh và tối ưu nhất ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ . Điều đó cũng lý giải vì sao ở nghiệm thức H25 và H30 thì hoạt lực tinh trùng có dấu hiệu giảm, điều này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyen Van Vui *et al.* (2020).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của các nồng độ tinh dầu lên tỷ lệ sống trung bình của tinh trùng (%) bảo quản lạnh**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12
H0	95,85 $\pm$ 1,34 <sup>aA</sup>	84,08 $\pm$ 1,53 <sup>cB</sup>	67,01 $\pm$ 2,26 <sup>bC</sup>	53,25 $\pm$ 3,27 <sup>bD</sup>	23,75 $\pm$ 2,72 <sup>deE</sup>
H5	95,73 $\pm$ 1,81 <sup>aA</sup>	86,41 $\pm$ 0,98 <sup>bcB</sup>	69,13 $\pm$ 2,24 <sup>bC</sup>	54,29 $\pm$ 3,31 <sup>bD</sup>	24,60 $\pm$ 3,47 <sup>deE</sup>
H10	96,36 $\pm$ 0,44 <sup>aA</sup>	87,33 $\pm$ 2,26 <sup>acB</sup>	70,69 $\pm$ 1,50 <sup>abC</sup>	56,22 $\pm$ 4,53 <sup>abD</sup>	28,35 $\pm$ 3,20 <sup>cdE</sup>
H15	95,88 $\pm$ 1,51 <sup>aA</sup>	88,21 $\pm$ 1,50 <sup>abB</sup>	72,68 $\pm$ 2,04 <sup>abC</sup>	58,89 $\pm$ 5,27 <sup>abD</sup>	34,56 $\pm$ 2,01 <sup>bcE</sup>
H20	95,94 $\pm$ 0,36 <sup>aA</sup>	90,50 $\pm$ 0,76 <sup>aB</sup>	76,87 $\pm$ 1,02 <sup>aC</sup>	64,65 $\pm$ 4,96 <sup>aD</sup>	42,14 $\pm$ 0,60 <sup>aE</sup>
H25	93,61 $\pm$ 2,31 <sup>abA</sup>	84,04 $\pm$ 1,53 <sup>cB</sup>	69,57 $\pm$ 1,00 <sup>bC</sup>	58,03 $\pm$ 2,95 <sup>abD</sup>	33,72 $\pm$ 2,46 <sup>bcE</sup>
H30	90,96 $\pm$ 2,83 <sup>baA</sup>	72,76 $\pm$ 1,56 <sup>dB</sup>	50,20 $\pm$ 5,62 <sup>cC</sup>	27,59 $\pm$ 2,66 <sup>cdD</sup>	21,55 $\pm$ 1,18 <sup>edE</sup>

Ghi chú: H0, H5, H10, H15, H20, H25 và H30 là các nghiệm thức tương ứng với nồng độ tinh dầu húng quế là 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30 $\mu\text{g/ml}$ . Giá trị là trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn cho 4 lần lặp lại. Các chữ mũ A, B, C, D và E khác biệt trong cùng 1 hàng thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P<0,05$ ). Các chữ mũ a, b, c và d khác biệt trong cùng 1 cột thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P<0,05$ ).

Kết quả bảng 3 cho thấy thời gian bảo quản lạnh càng lâu thì tỷ lệ sống của tinh trùng càng giảm và tỷ lệ tinh trùng sống tốt càng tăng khi được bổ sung tinh dầu húng quế vào môi trường pha loãng trong 12 ngày bảo quản. Tại nồng độ

tinh dầu 20 $\mu\text{g/ml}$ , tỷ lệ phần trăm tinh trùng sống trung bình cao nhất với 64,65 $\pm$ 4,96% ở ngày 9; cao hơn so với nghiệm thức đối chứng H0 là 53,25 $\pm$ 3,27% và H30 là 27,59 $\pm$ 2,66% ( $P<0,05$ ). Nghiệm thức H30 có tỷ lệ phần trăm

tinh trùng sống trung bình thấp nhất khác biệt so với các nghiệm thức còn lại từ ngày 1 đến ngày 12 ( $P < 0,05$ ).

Trong những năm gần đây, có nhiều báo cáo sử dụng các chất bổ sung để bảo quản lạnh tinh trùng chó như sử dụng tinh dầu *Ocimum gratissimum* ở nồng độ  $100\mu\text{g/ml}$  cho hiệu quả bảo quản lạnh tinh trùng chó lên đến 12 ngày (Nguyen Van Vui *et al.*, 2020); bổ sung procyanidin ở nồng độ  $30\mu\text{g/ml}$  có khả năng bảo vệ tinh trùng chó trong 72 giờ ở  $4^\circ\text{C}$  (Huang

*et al.*, 2022). Tinh dầu húng quế chứa nhiều vitamin, năng lượng và chất khoáng, nhất là magnesium (Võ Văn Chi, 2012). Những chất này có thể hỗ trợ năng lượng cho các hoạt động của tinh trùng, và duy trì sự cân bằng thẩm thấu cũng như thành phần của các enzyme chính liên quan đến quá trình chuyển hóa và chức năng của tinh trùng (Juyena và Stelletta, 2012; Smith *et al.*, 2018) góp phần tăng tỷ lệ sống cho tinh trùng, hỗ trợ cho tinh trùng hoạt động mạnh mẽ hơn so với đối chứng.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của các nồng độ tinh dầu lên tính toàn vẹn trung bình của màng tinh trùng (%) bảo quản lạnh**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12
H0	95,64±1,18 <sup>aA</sup>	83,24±2,15 <sup>dB</sup>	65,48±3,69 <sup>cC</sup>	51,70±1,92 <sup>cD</sup>	21,88±3,15 <sup>dE</sup>
H5	95,90±1,67 <sup>aA</sup>	86,14±0,85 <sup>bdB</sup>	68,97±1,84 <sup>bcC</sup>	70,43±1,56 <sup>aC</sup>	28,21±3,28 <sup>cD</sup>
H10	96,08±0,60 <sup>aA</sup>	87,31±2,35 <sup>abcB</sup>	70,43±1,56 <sup>abcC</sup>	56,30±4,38 <sup>bcD</sup>	28,21±3,28 <sup>cE</sup>
H15	95,79±1,30 <sup>aA</sup>	88,09±1,26 <sup>abB</sup>	72,83±2,11 <sup>abC</sup>	58,94±4,81 <sup>bcD</sup>	34,83±2,25 <sup>bE</sup>
H20	95,90±0,42 <sup>aA</sup>	90,30±0,79 <sup>aB</sup>	76,66±0,85 <sup>aC</sup>	64,46±4,96 <sup>abD</sup>	42,13±0,83 <sup>aE</sup>
H25	93,06±2,68 <sup>abA</sup>	83,90±1,42 <sup>cdB</sup>	69,74±0,67 <sup>abcC</sup>	57,83±3,22 <sup>bcD</sup>	33,65±2,32 <sup>bcE</sup>
H30	90,96±2,73 <sup>bA</sup>	72,52±1,54 <sup>dB</sup>	50,01±5,84 <sup>dC</sup>	25,80±3,65 <sup>dD</sup>	19,88±1,98 <sup>dD</sup>

*Ghi chú:* H0, H5, H10, H15, H20, H25 và H30 là các nghiệm thức tương ứng với nồng độ tinh dầu húng quế là 0, 5, 10, 15, 20, 25 và  $30\mu\text{g/ml}$ . Giá trị là trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn cho 4 lần lặp lại. Các chữ mũ A, B, C, D và E khác biệt trong cùng 1 hàng thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Các chữ mũ a, b, c và d khác biệt trong cùng 1 cột thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Kết quả bảng 4 cho thấy ở tất cả các nghiệm thức tỷ lệ phần trăm tính toàn vẹn màng tinh trùng đều giảm dần theo thời gian 12 ngày bảo quản. Nghiệm thức H20 cho kết quả cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức H0 và H30 ( $P < 0,05$ ). Cụ thể vào ngày thứ 9, nghiệm thức H20 có tỷ lệ phần trăm tính toàn vẹn màng tinh trùng là  $64,46 \pm 4,96\%$ ; trong khi ở H0 là  $51,70 \pm 1,92\%$  và H30 là  $25,80 \pm 3,65\%$ . Khác biệt này còn rõ ràng hơn vào ngày 12, khi số tinh trùng toàn vẹn màng cao gấp đôi nghiệm thức đối chứng và H30 ( $P < 0,05$ ).

Tinh dầu húng quế ở nồng độ  $20\mu\text{g/ml}$  có khả năng bảo vệ tốt tính toàn vẹn cho màng tinh trùng chó trong 12 ngày ở điều kiện bảo quản

lạnh. Tinh trùng chó ở  $4-8^\circ\text{C}$  gây ra những biến đổi nội và ngoại tế bào gây tổn thương đến khả năng sống và khả năng thụ tinh của tinh trùng (Martínez-Barbitta và Rivera Salinas, 2022). Đặc biệt là thành phần estragole trong tinh dầu húng quế khi sử dụng ở nồng độ phù hợp thì các hoạt chất kháng oxy hóa sẽ bảo vệ màng tế bào nhưng ngược lại nếu ở nồng độ cao sẽ gây độc cho tế bào, biến đổi hình thái, phá vỡ màng hạt nhân, tăng cường sự tự tổ hợp của chromatin và phá hủy tính toàn vẹn của màng tế bào (Laskari *et al.*, 2020). Eugenol và linalool làm thay đổi tính thẩm của màng, ảnh hưởng đến việc vận chuyển các ion, ATP và thay đổi cấu trúc acid béo (Nazzaro *et al.*, 2013), từ đó giúp ổn định màng tinh trùng.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của các nồng độ tinh dầu húng quế lên khả năng bị oxy hóa (mmol MDA/50x10<sup>6</sup> tinh trùng) khi bảo quản lạnh**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12
H0	13,50 ± 0,46 <sup>aD</sup>	14,24 ± 0,06 <sup>aD</sup>	26,26 ± 0,22 <sup>abC</sup>	28,94 ± 0,28 <sup>abB</sup>	31,85 ± 0,40 <sup>aA</sup>
H5	11,29 ± 0,56 <sup>abD</sup>	11,85 ± 0,10 <sup>bD</sup>	25,36 ± 0,43 <sup>abC</sup>	27,73 ± 0,02 <sup>cB</sup>	30,06 ± 0,32 <sup>bA</sup>
H10	9,03 ± 0,12 <sup>bcdE</sup>	10,78 ± 0,30 <sup>bcD</sup>	24,62 ± 0,69 <sup>bcC</sup>	26,37 ± 0,05 <sup>dB</sup>	29,32 ± 0,16 <sup>bA</sup>
H15	7,75 ± 0,08 <sup>cdE</sup>	9,12 ± 0,03 <sup>cdD</sup>	22,84 ± 0,59 <sup>cC</sup>	25,37 ± 0,12 <sup>eB</sup>	26,15 ± 0,33 <sup>cA</sup>
H20	6,70 ± 0,11 <sup>dD</sup>	8,01 ± 0,05 <sup>dC</sup>	19,33 ± 0,44 <sup>dB</sup>	24,34 ± 0,63 <sup>fA</sup>	25,25 ± 0,18 <sup>dA</sup>
H25	9,88 ± 1,81 <sup>bcd</sup>	10,74 ± 1,23 <sup>bcD</sup>	22,41 ± 0,14 <sup>cC</sup>	28,05 ± 0,69 <sup>bcB</sup>	29,36 ± 0,05 <sup>bA</sup>
H30	11,26 ± 1,91 <sup>abE</sup>	13,89 ± 1,62 <sup>aD</sup>	26,67 ± 1,66 <sup>aC</sup>	29,83 ± 0,18 <sup>aB</sup>	32,10 ± 0,62 <sup>aA</sup>

Ghi chú: H0, H5, H10, H15, H20, H25 và H30 là các nghiệm thức tương ứng với nồng độ tinh dầu húng quế là 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30µg/ml. Giá trị là trung bình ± độ lệch chuẩn cho 4 lần lặp lại. Các chữ mũ A, B, C, D và E khác biệt trong cùng 1 hàng thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Các chữ mũ a, b, c và d khác biệt trong cùng 1 cột thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Kết quả bảng 5 cho thấy nồng độ MDA tăng dần từ ngày 1 đến ngày 12. Nồng độ MDA trong từng ngày kiểm tra giảm dần từ nghiệm thức đối chứng đến nghiệm thức H20 và sau đó tăng dần ở nghiệm thức H25 và H30. Nghiệm thức H20 (20µg/ml) có nồng độ MDA thấp nhất ở ngày 6, 9, 12 và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ( $P < 0,05$ ).

Nồng độ MDA là dấu hiệu của peroxy hóa lipid như một dấu hiệu của stress oxy hóa, nồng độ càng cao thì chất lượng tinh trùng càng giảm (Tavilani *et al.*, 2005). Nồng độ MDA tăng dần là do quá trình môi trường bảo quản bị oxy hóa và sự chết đi của tinh trùng. Nồng độ MDA giảm dần từ nghiệm thức bổ sung tinh dầu ở nồng độ thấp đến cao do sự tăng dần nồng độ các hoạt chất kháng oxy hóa có trong tinh dầu húng quế giúp bảo vệ tế bào tinh trùng, giảm khả năng bị oxy hóa. Mặt khác, nếu nồng độ chất chống oxy hóa quá cao sẽ tăng tính thấm của màng sinh chất, tinh trùng nhạy cảm hơn, mất khả năng vận động do quá trình suy giảm ATP nội bào và quá trình phosphoryl hóa protein (Sanocka và Kurpysz, 2004) làm tăng tỷ lệ tinh trùng chết nên nồng độ MDA tăng lên.

#### IV. KẾT LUẬN

Tinh dầu húng quế chứa nhiều hợp chất chống oxy hóa tác dụng có lợi cho tinh trùng khi bổ sung vào môi trường pha loãng bảo quản lạnh nhưng phụ thuộc theo các mức nồng độ khác nhau. Bổ sung tinh dầu húng quế ở nồng độ 20µg/ml thì đạt hiệu quả tối ưu nhất, cải thiện chất lượng tinh trùng về hoạt lực tiến thẳng, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng và khả năng bị oxy hóa. Tuy vậy nếu ở nồng độ cao hơn thì có ảnh hưởng không tốt làm giảm chất lượng tinh trùng khi bảo quản lạnh. Đây là kết quả nghiên cứu trong nước đầu tiên sử dụng tinh dầu húng quế là một loại thảo dược địa phương, rẻ tiền giúp kéo dài thời gian bảo quản lạnh tinh trùng và là tiền đề để nghiên cứu bảo quản trữ đông tinh trùng chó. Điều này mở ra triển vọng nâng cao giá trị di truyền và lai tạo, giảm bớt khó khăn trong việc vận chuyển và chi phí phục vụ cho công tác thụ tinh nhân tạo trên chó.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S., 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. In *Cell and Tissue Banking*, 17 (4): 745–756.
- Bouchard, G. F., Morris, J. K., Sikes, J. D., & Youngquist, R. S., 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different

- semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, 34(1):147–157.
3. Bresciani, C., Cabassi, C. S., Morini, G., Taddei, S., Bettini, R., Bigliardi, E., Di Ianni, F., Sabbioni, A., & Parmigiani, E., 2014. Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1):83–87.
  4. Cook, N. C., & Samman, S., 1996. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2):66–76.
  5. Đỗ Huy Bích, 2006. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
  6. Farouk, A., Fikry, R., & Mohsen, M., 2016. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Ocimum basilicum* L. Essential Oil Cultivated in Madinah Monawara, Saudi Arabia and its Comparison to the Egyptian Chemotype. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 19(5):1119–1128.
  7. Forouzandeh, M., Fanoudi, M., Arazmjou, E., & Tabiei, H., 2012. Effect of drought stress and types of fertilizers on the quantity and quality of medicinal plant Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Indian J. Innovations Dev.*, 1(9):696–699.
  8. Haerani, A., Chaerunisa, A. Y., & Subarnas, A., 2019. Antioxidant Activities of *Muntingia calabura*, *Syzygium cumini*, *Ocimum basilicum*, and *Eleutherine bulbosa* using DPPH Method. *Indonesian Journal of Pharmaceutics*, 1(2):83–87.
  9. Chemineau, and Caynie, Y., 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO. *Animal production and Health*. 83 - Rome, Italia.
  10. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Baerheim Svendsen, A., 1987. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods. In *Planta Medica*, 53 (5):395–398.
  11. Jayasinghe, C., Goto, N., Aoki, T., & Wada, S., 2003. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15):4442–4449.
  12. Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlaisavljevic, S., & Trivic, S., 2011. Antioxidant capacity of *ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*, 16(9):7401–7414.
  13. Mandal, S., Mandal, M. D., & Pal, N. K., 2012. Enhancing chloramphenicol and trimethoprim in vitro activity by *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae) leaf extract against *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(3):220–224.
  14. Lashkari A, Najafi F, Kavooosi G, Niazi S, 2020. Evaluating the In vitro anti-cancer potential of estragole from the essential oil of *Agastache foeniculum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27(10):17–27.
  15. Martínez-Barbitta, M., & Rivera Salinas, C., 2022. Evaluation of Chilled Dog Semen Extended With Sperm Activator. *Frontiers in Veterinary Science*, 8:.
  16. Mensor, L., Menezes, F., G. L.-P., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Wiley Online Library*, Retrieved March 27, 2023.
  17. Moradi, M., Karimi, I., Ahmadi, S., & Mohammed, L. J., 2020. The necessity of antioxidant inclusion in caprine and ovine semen extenders: A systematic review complemented with computational insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9):1027–1043.
  18. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. In *Pharmaceutics*, 6 (12):1451–1474.
  19. Nguyen, Van Vui, Ponchunchoovong, S., Kupittayanant, S., & Kupittayanant, P., 2020. Antioxidant Effects of *Ocimum Gratissimum* Leaf Essential Oils as a Supplement to Extender on Chilled Canine Sperm Quality. *Research Square*, 1–23.
  20. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., & De Kruif, A., 2002. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 57(6):1669–1681.
  21. Rota, A., Ström, B., & Linde-Forsberg, C., 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology*, 44(6):885–900.
  22. Sanocka, D., & Kurpisz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. In *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 48–54.
  23. Sharma, O. P., & Bhat, T. K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4):1202–1205.
- Ngày nhận: 8-6-2023  
 Ngày phản biện: 28-8-2023  
 Ngày đăng: 1-6-2024