

# ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BỔ SUNG TINH DẦU LÁ TÍA TÔ (*PERILLA FRUTESCENS*) VÀO MÔI TRƯỜNG PHA LOÃNG LÊN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG GÀ BẢO QUẢN LẠNH

Nguyễn Thành Đức Nghĩa, Võ Thị Huỳnh Như, 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 hóa là một thách thức lớn trong quá trình bảo quản lạnh tinh trùng gà. Nghiên cứu bổ sung tinh dầu lá tía tô vào môi trường pha loãng, bảo quản tinh được thực hiện nhằm duy trì và ổn định chất lượng tinh trùng gà trong quá trình bảo quản lạnh. Chất lượng tinh trùng được đánh giá thông qua các chỉ tiêu, bao gồm: hoạt lực, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng và khả năng chống peroxide hóa lipid trong suốt thời gian bảo quản lạnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chất lượng tinh trùng gà được cải thiện khi bổ sung tinh dầu lá tía tô từ nồng độ thấp đến 1,5µg/ml vào môi trường pha loãng, bảo quản tinh và chất lượng tinh trùng giảm dần khi bổ sung tinh dầu ở các nồng độ cao hơn 1,5µg/ml. Đặc biệt, nghiệm thức bổ sung tinh dầu ở nồng độ 1,5µg/ml vào môi trường pha loãng, bảo quản tinh đã cho chất lượng tinh trùng cao nhất về hoạt lực tiến thẳng, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn của màng và khả năng chống peroxide hóa lipid của tinh trùng trong 21 ngày bảo quản lạnh và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (không bổ sung tinh dầu) ( $P<0,05$ ). Tóm lại, ảnh hưởng của tinh dầu lá tía tô đến chất lượng tinh trùng gà trong bảo quản lạnh phụ thuộc vào nồng độ tinh dầu và nồng độ tối ưu thêm vào môi trường pha loãng trong suốt thời gian bảo quản lạnh cho tinh trùng gà là 1,5µg/ml.

*Từ khóa:* Tía tô, tinh dầu, tinh trùng gà, bảo quản lạnh.

## Effects of supplementing *Perilla frutescens* leaf essential oil into semen extender on the chicken sperm quality in cold storage

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

## SUMMARY

Oxidative stress is a significant challenge during the period of chicken sperm cold storage. Study on supplementing *Perilla frutescens* leaf essential oil into semen extender was conducted aimed at maintaining and stabilizing chicken sperm quality during the period of cold storage. Sperm quality was evaluated through various parameters, such as: sperm motility, survival rate, membrane integrity and resistance to lipid peroxidation during cold storage. The studied results indicated that the quality of chicken sperm was improved when adding *Perilla frutescens* essential oil into semen extender at concentrations ranging from low to 1.5 µg/ml, and sperm quality gradually decreased when *Perilla frutescens* essential oil was added into semen extender with concentration higher than 1.5 µg/ml. Particularly, supplementing *Perilla frutescens* essential oil with concentration of 1.5 µg/ml into semen extender has given the highest sperm quality in terms of forward motility, viability, membrane integrity, and resistance to lipid peroxidation over 21-days of cold storage in comparison with the control ( $P<0.05$ ). In conclusion, the influence of *Perilla frutescens* essential oil on the quality of chicken sperm in cold storage depends on the essential oil concentration, and the optimal concentration adding into semen extender throughout the chicken sperm cold storage period was 1.5 µg/ml.

*Keywords:* *Perilla frutescens*, essential oil, chicken sperm, cold storage.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thụ tinh nhân tạo giúp ngăn ngừa và giảm thiểu các bệnh truyền nhiễm lây lan qua đường sinh dục và lãng phí nguồn tinh dịch ở gà. Để duy trì tinh trùng luôn ổn định và đảm bảo chất lượng sau khi pha loãng vào môi trường bảo quản góp phần phục vụ cho gieo tinh nhân tạo, tinh trùng phải được bảo quản lạnh (5°C) hoặc trữ đông (-196°C) (Thomassen và cs., 2006). Tuy nhiên, quá trình bảo quản lạnh sẽ tạo ra sự thay đổi về sinh hoá và vật lý tinh trùng gà như ức chế sự hoạt động của chất chống oxy hoá (Partyka và cs., 2012) và gây stress oxy hoá (Gharagozloo và cs., 2011) do phản ứng với các gốc oxy hoá của tế bào (ROS-Reactive oxygen species). Ngoài ra, màng tinh trùng chứa nhiều acid béo chưa bão hoà nên dễ bị stress oxy hoá do ROS, dẫn đến làm tăng tính thấm, gây hư hại màng của tinh trùng, acrosome, màng ty thể và DNA, kết quả làm tinh trùng bất hoạt và chết (Moghbeli và cs., 2016). Do đó, việc bổ sung các chất kháng oxy hóa vào môi trường pha loãng tinh trùng có thể làm giảm stress oxy hóa và góp phần kéo dài thời gian bảo quản tinh trùng. Vui và cs. (2019) đã chứng minh việc bổ sung tinh dầu hương nhu (*Ocimum gratissimum*) với nồng độ 100µg/ml tác dụng có lợi cho chất lượng tinh trùng chó. Ngoài ra, việc bổ sung chất kháng oxy hoá ngoại sinh có nguồn gốc từ thảo dược và từ hóa chất như chiết xuất từ trái oliu (Seyed và cs., 2016), tinh dầu dương kỳ thảo (Thananurak và cs., 2020), flavonoid quercetin (Tang và cs., 2021) đã cải thiện được chất lượng tinh trùng gà trong quá trình bảo quản. Vì vậy, việc bổ sung tinh dầu có nguồn gốc thảo dược có thể góp phần đảm bảo tinh trùng gà luôn được ổn định về chất lượng trong suốt thời gian bảo quản.

Trong tinh dầu tía tô có nhiều hợp chất flavonoid (anthocyanin, flavonol glycosid, luteolin) và phenolic (hydroxybenzoic, acid caffeic, acid rosmarinic) nên có tính kháng oxy hóa mạnh (Nguyễn Thị Hoàng Lan và cs., 2015). 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 tía tô (*Perilla frutescens*) 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, đối tượng nghiên cứu

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

Gà được chọn nghiên cứu là giống gà Nòi lai 8 tháng tuổi, với số lượng là 10 con và được kiểm chứng về khả năng sinh sản.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Ly trích và phân tích thành phần tinh dầu lá Tía tô

Ly trích tinh dầu lá tía tô bằng phương pháp chưng cất hơi nước của Trần Thanh Quỳnh Anh và cs. (2020). Tía tô tươi được để khô héo tự nhiên trong 2-3 giờ và được sấy khô hoàn toàn trong 60 giờ. Sau đó, đem nguyên liệu tía tô đã sấy khô cho vào máy nghiền nhuyễn thành bột. Cân 150g bột tía tô và 600ml nước cất vào bình cầu 1.000ml của hệ thống chưng cất tinh dầu Clevenger, đun nóng ở nhiệt độ 60°C-70°C và chưng cất trong khoảng 3-4 giờ để thu tinh dầu tía tô. Sau khi tách nước bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , thu được tinh dầu nguyên chất và bảo quản ở 0-4°C trước khi sử dụng. Phân tích thành phần và hàm lượng các hợp chất dễ bay hơi trong tinh dầu bằng phương pháp sắc ký khí - quang phổ khối (GC-MS).

Hoạt tính kháng 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.

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

Môi trường pha loãng cơ bản Besltsville dùng

trong thí nghiệm này được mô tả bởi Amini và cs. (2015). Thành phần các môi trường sử dụng trong thí nghiệm được thể hiện trong bảng 1.

**Bảng 1. Môi trường pha loãng tinh trùng gà bảo quản lạnh**

Thành phần	Nghiệm thức						
	ĐC	TT-1	TT-2	TT-3	TT-4	TT-5	TT-6
Kali citrat 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 photphat dibasic trihydrate (g)	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59
Kali photphat 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 1.000	Đủ 1.000	Đủ 1.000	Đủ 1000	Đủ 1.000	Đủ 1.000	Đủ 1.000
Tinh dầu (mg)*	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

*Ghi chú: ĐC: đối chứng; TT-1, TT-2, TT-3, TT-4, TT-5, TT-6: nghiệm thức bổ sung 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0µg/ml tinh dầu tương ứng, \* Tinh dầu chiết xuất từ lá tía tô*

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 7 nghiệm thức với các nồng độ tinh dầu khác nhau: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0µg/ml. Thí nghiệm được lặp lại 4 lần và thực hiện kiểm tra tái đo lường trong thời gian 21 ngày (3 ngày/lần) để đánh giá chất lượng tinh trùng về hoạt lực, tỷ lệ sống, tinh toàn vẹn màng và khả năng bị oxy hóa của tinh trùng.

Tinh dịch gộp từ 10 gà trống được pha loãng với các môi trường pha loãng ở tỷ lệ 1:15 để đạt được nồng độ 200x10<sup>6</sup> tinh trùng/ml. Sau đó, 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.

**2.3.3. Kiểm tra hoạt lực của tinh trùng**

Hoạt lực tinh trùng được xác định theo Đào Đức Thà (2006). Nhỏ một giọt (8 µl) tinh dịch lên lam kính đã được làm ấm trong bể điều nhiệt (37°C) và dàn đều các gốc lamen. Sau đó, soi dưới kính hiển vi, độ phóng đại 40X. Tiến hành

đếm và tính hoạt lực tổng số (HLTS) và hoạt lực tiến thẳng (HLTT).

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

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

**2.3.4. Tỷ lệ sống của tinh trùng**

Tinh trùng sống được xác định bằng phương pháp nhuộm Eosin-Nigrosin (Chalah và cs., 1999). Nhỏ 5µL dung dịch Eosin-Nigrosin lên lam kính, tiếp theo nhỏ 5µL mẫu tinh dịch pha loãng và dàn đều hỗn hợp trên lam kính. Sau khi mẫu khô tự nhiên và quan sát bằng kính hiển vi, độ phóng đại 40X. Tinh trùng chết: màng sinh chất không nguyên vẹn, cho phép sự xâm nhập của thuốc nhuộm Eosin-Nigrosin đi vào và bắt màu thuốc nhuộm. Ngược lại, tinh trùng sống vẫn giữ nguyên màu trắng vốn có của nó.

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

### 2.3.5. Tính toán vện màng tinh trùng

Độ phòng nhược thẩm thấu (HOST: Hypo-Osmotic Swelling Test) để đánh giá sự toàn vẹn màng sinh chất tinh trùng trong quá trình bảo quản lạnh theo mô tả của Shahverdi và cs. (2015). Cho 30ml tinh dịch ( $200 \times 10^6$  tinh trùng/ml) với 300ml dung dịch nhược trương 100 mOsm/kg (9g/l fructose và 4,9g/l sodium citrate trong nước cất). Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 30 phút. Tổng cộng 0,2ml hỗn hợp được quan sát dưới kính hiển vi, độ phóng đại 40X. Ghi nhận ít nhất 200 tinh trùng (đuôi căng phồng: chức năng màng nguyên vẹn, tinh trùng còn sống; không căng phồng: chức năng màng không còn nguyên vẹn, tinh trùng chết).

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

### 2.3.6. Đánh giá khả năng bị oxy hóa tinh trùng

Khả năng bị oxy hóa tinh trùng được xác định bằng phản ứng với acid thiobarbituric (TBAR) (Ohkawa và cs., 1979) thông qua hàm lượng malondialdehyde (MDA) được sản sinh. Lấy 0,3ml dung dịch mẫu từng nghiệm thức cho phản ứng với 0,6ml TBAR ở 90°C trong 15 phút và đo độ hấp thụ tại bước sóng 405 nm. Hàm lượng MDA (nmol MDA/ $50 \times 10^6$  tinh trùng) được tính dựa theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA.

### 2.3.7. Phân tích thống kê

Phân tích phương sai 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 hai nhân tố trên. 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 và phân tích thành phần tinh dầu tía tô

Ly trích 150 gram bột tía tô thu được thể tích tinh dầu là 0,3ml với các đặc điểm cảm quan: có màu vàng cam; mùi thơm dịu nhẹ của tía tô; vị đắng nhẹ, hơi the. Kết quả này phù hợp với tiêu chuẩn đánh giá cảm quan tinh dầu theo TCVN 8460:2010.

Bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC-MS) đã xác định được các thành phần hóa học có trong tinh dầu tía tô bao gồm: perilla aldehyde (65,234%),  $\beta$ -caryophyllene (7,585%), (3Z,6E)- $\alpha$ -farnesene (6,251%), D-limonene (5,418%),  $\beta$ -linalool (1,303%), perillal alcohol (1,428%), eugenol (0,695%).

Nồng độ tinh dầu tía tô ức chế hoạt tính DPPH 50% ( $IC_{50}$ ) cao hơn nồng độ của chất chuẩn vitamin E lần lượt là 508,91 $\mu$ g/ml và 45,18 $\mu$ g/ml.

### 3.2. Kết quả hoạt lực tinh trùng

Hoạt lực tổng số (HLTS) và hoạt lực tiến thẳng (HLTT) được trình bày tại bảng 2. Nhìn chung, tinh trùng ở các nghiệm thức giảm dần đều về chỉ tiêu HLTS và HLTT trong bảo quản lạnh 21 ngày. Có sự khác biệt rõ và cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) về hoạt lực tinh trùng ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu Tía tô ở nồng độ khác nhau đối với nghiệm thức đối chứng không bổ sung tinh dầu tía tô. Kết quả HLTT và HLTS của nghiệm thức được bổ sung nồng độ tinh dầu 1,5 $\mu$ g/ml luôn duy trì, ổn định ở mức cao hơn và có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng ( $85,83 \pm 4,39$  so với  $75,49 \pm 0,69$  ngày thứ 3;  $73,41 \pm 7,25$  so với  $61,49 \pm 1,28$  ngày thứ 9;  $57,35 \pm 6,21$  so với  $44,72 \pm 1,12$  ngày thứ 15 và  $36,99 \pm 5,08$  so với  $27,57 \pm 2,37$  ngày thứ 21).

**Bảng 2. Tỷ lệ hoạt lực tiên thắng (HLTT) và hoạt lực tổng số (HLTS) của tinh trùng gà khi bảo quản lạnh (%)**

Chỉ tiêu	Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
HLTT (%)	ĐC	81,02 ± 0,78 <sup>a</sup>	75,49 ± 0,69 <sup>b</sup>	70,06 ± 0,88 <sup>b</sup>	61,49 ± 1,28 <sup>b</sup>	54,91 ± 0,88 <sup>b</sup>	44,72 ± 1,12 <sup>c</sup>	35,11 ± 1,90 <sup>b</sup>	27,57 ± 2,37 <sup>d</sup>
	TT-1	83,98 ± 1,04 <sup>bc</sup>	77,07 ± 1,92 <sup>b</sup>	72,77 ± 2,07 <sup>abc</sup>	63,98 ± 3,12 <sup>b</sup>	57,23 ± 3,00 <sup>b</sup>	46,53 ± 1,97 <sup>bc</sup>	36,44 ± 1,38 <sup>b</sup>	30,54 ± 1,28 <sup>bc</sup>
	TT-2	85,49 ± 1,49 <sup>bc</sup>	80,35 ± 1,79 <sup>ab</sup>	74,19 ± 2,46 <sup>abc</sup>	67,90 ± 2,62 <sup>ab</sup>	61,39 ± 2,49 <sup>ab</sup>	51,53 ± 4,11 <sup>abc</sup>	41,60 ± 3,68 <sup>ab</sup>	32,91 ± 1,48 <sup>ab</sup>
	TT-3	90,57 ± 4,11 <sup>a</sup>	85,83 ± 4,39 <sup>a</sup>	79,13 ± 7,39 <sup>a</sup>	73,41 ± 7,25 <sup>a</sup>	67,21 ± 7,91 <sup>a</sup>	57,35 ± 6,21 <sup>a</sup>	47,96 ± 6,56 <sup>a</sup>	36,99 ± 5,08 <sup>a</sup>
	TT-4	86,51 ± 1,90 <sup>ab</sup>	80,33 ± 1,85 <sup>ab</sup>	73,86 ± 2,89 <sup>abc</sup>	68,10 ± 2,67 <sup>ab</sup>	61,96 ± 3,40 <sup>ab</sup>	53,77 ± 3,25 <sup>ab</sup>	43,57 ± 2,89 <sup>ab</sup>	34,26 ± 2,57 <sup>ab</sup>
	TT-5	82,99 ± 0,79 <sup>bc</sup>	77,87 ± 2,09 <sup>b</sup>	71,75 ± 2,44 <sup>abc</sup>	65,99 ± 3,20 <sup>ab</sup>	60,01 ± 4,05 <sup>ab</sup>	51,41 ± 3,36 <sup>bc</sup>	41,06 ± 4,88 <sup>ab</sup>	32,42 ± 1,10 <sup>bc</sup>
	TT-6	81,43 ± 1,19 <sup>a</sup>	76,15 ± 1,30 <sup>b</sup>	69,97 ± 2,35 <sup>b</sup>	64,27 ± 2,22 <sup>b</sup>	57,32 ± 2,33 <sup>b</sup>	50,18 ± 2,52 <sup>bc</sup>	39,25 ± 3,95 <sup>ab</sup>	30,85 ± 0,92 <sup>bc</sup>
HLTS (%)	ĐC	93,38 ± 0,35 <sup>A</sup>	90,7 ± 0,74 <sup>b</sup>	88,35 ± 0,88 <sup>b</sup>	83,37 ± 0,59 <sup>c</sup>	79,55 ± 1,02 <sup>c</sup>	75,44 ± 0,69 <sup>c</sup>	66,65 ± 3,16 <sup>c</sup>	60,99 ± 5,28 <sup>d</sup>
	TT-1	93,94 ± 0,55 <sup>A</sup>	91,67 ± 0,52 <sup>ab</sup>	88,91 ± 0,56 <sup>ab</sup>	86,24 ± 0,90 <sup>bc</sup>	80,48 ± 1,24 <sup>cd</sup>	75,30 ± 0,88 <sup>c</sup>	68,31 ± 2,90 <sup>bc</sup>	64,08 ± 3,65 <sup>d</sup>
	TT-2	94,59 ± 1,06 <sup>A</sup>	92,45 ± 0,78 <sup>ab</sup>	89,99 ± 0,84 <sup>ab</sup>	87,74 ± 1,59 <sup>ab</sup>	84,26 ± 1,71 <sup>b</sup>	77,42 ± 2,93 <sup>bc</sup>	70,92 ± 3,48 <sup>bc</sup>	65,20 ± 3,91 <sup>d</sup>
	TT-3	95,74 ± 2,10 <sup>A</sup>	94,00 ± 2,42 <sup>a</sup>	92,19 ± 2,80 <sup>a</sup>	90,04 ± 2,47 <sup>a</sup>	87,92 ± 2,23 <sup>a</sup>	84,15 ± 2,01 <sup>a</sup>	77,91 ± 1,45 <sup>a</sup>	69,15 ± 4,43 <sup>d</sup>
	TT-4	94,56 ± 1,58 <sup>A</sup>	92,29 ± 0,95 <sup>ab</sup>	89,27 ± 1,04 <sup>ab</sup>	86,61 ± 0,84 <sup>bc</sup>	83,74 ± 1,45 <sup>bc</sup>	80,28 ± 0,69 <sup>b</sup>	74,60 ± 0,44 <sup>ab</sup>	68,07 ± 2,61 <sup>d</sup>
	TT-5	93,51 ± 1,08 <sup>A</sup>	92,05 ± 0,23 <sup>ab</sup>	88,98 ± 1,43 <sup>ab</sup>	86,68 ± 0,93 <sup>b</sup>	83,77 ± 1,32 <sup>bc</sup>	79,23 ± 0,80 <sup>b</sup>	72,31 ± 2,44 <sup>ab</sup>	66,90 ± 1,33 <sup>d</sup>
	TT-6	93,03 ± 0,58 <sup>A</sup>	90,63 ± 0,74 <sup>b</sup>	87,65 ± 1,21 <sup>b</sup>	85,46 ± 1,03 <sup>bc</sup>	81,82 ± 1,08 <sup>bcd</sup>	77,35 ± 1,12 <sup>bc</sup>	70,32 ± 3,80 <sup>bc</sup>	64,43 ± 3,56 <sup>d</sup>

Ghi chú: ĐC: đối chứng; TT-1, TT-2, TT-3, TT-4, TT-5, TT-6: nghiệm thức bổ sung 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0µg/ml tinh dầu tương ứng. Các chữ cái viết thường (a, b, c và d) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 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).

**3.3. Tỷ lệ sống của tinh trùng (%)**

Theo kết quả tại bảng 3, chỉ tiêu tỷ lệ sống của tinh trùng khi thực hiện nhuộm Eosin - Nigrosin ở các nghiệm thức thí nghiệm đều giảm dần theo thời gian bảo quản lạnh. Ngoài ra, tinh trùng có

tỷ lệ sống ở nghiệm thức 1,5µg/ml luôn ổn định, duy trì ở mức cao và có ý nghĩa thống kê (P<0,05) so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung tinh dầu (87,55 ± 0,13 so với 84,53 ± 0,36 ngày thứ 1; 62,53 ± 2,93 so với 58,76 ± 2,90 ngày thứ 12 và

42,33 ± 2,83 so với 31,44 ± 1,20 ngày thứ 21). 1,5µg/ml giúp bảo vệ và duy trì tỷ lệ sống tốt cho  
 Chứng tỏ việc bổ sung tinh dầu tía tô ở nồng độ tinh trùng trong bảo quản lạnh.

**Bảng 3. Tỷ lệ sống của tinh trùng khi bảo quản lạnh (%)**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
ĐC	84,53 ± 0,36 <sup>abA</sup>	77,13 ± 0,36 <sup>bcB</sup>	73,37 ± 0,90 <sup>abC</sup>	65,29 ± 1,32 <sup>D</sup>	58,76 ± 2,90 <sup>E</sup>	51,51 ± 0,55 <sup>F</sup>	43,66 ± 0,40 <sup>G</sup>	31,44 ± 1,20 <sup>bcH</sup>
TT-1	85,20 ± 0,36 <sup>abA</sup>	78,50 ± 1,52 <sup>bcB</sup>	73,02 ± 2,26 <sup>abcC</sup>	66,54 ± 2,51 <sup>D</sup>	60,60 ± 2,83 <sup>E</sup>	53,96 ± 3,03 <sup>F</sup>	47,22 ± 1,57 <sup>G</sup>	36,48 ± 2,45 <sup>abH</sup>
TT-2	85,49 ± 0,89 <sup>abA</sup>	78,98 ± 0,65 <sup>bB</sup>	73,54 ± 1,62 <sup>abcC</sup>	67,14 ± 3,37 <sup>D</sup>	61,70 ± 3,21 <sup>E</sup>	55,04 ± 3,59 <sup>F</sup>	48,66 ± 3,31 <sup>G</sup>	41,35 ± 3,38 <sup>abH</sup>
TT-3	87,55 ± 0,13 <sup>aA</sup>	81,70 ± 0,66 <sup>aB</sup>	76,43 ± 2,81 <sup>aC</sup>	69,24 ± 2,01 <sup>D</sup>	62,53 ± 2,93 <sup>E</sup>	55,88 ± 4,07 <sup>F</sup>	49,21 ± 3,35 <sup>G</sup>	42,33 ± 2,83 <sup>abH</sup>
TT-4	84,65 ± 1,96 <sup>abA</sup>	79,69 ± 0,96 <sup>abB</sup>	74,26 ± 1,19 <sup>abC</sup>	69,18 ± 1,79 <sup>D</sup>	62,02 ± 2,52 <sup>E</sup>	55,97 ± 5,56 <sup>F</sup>	48,99 ± 5,08 <sup>G</sup>	40,82 ± 4,31 <sup>abH</sup>
TT-5	83,61 ± 1,77 <sup>abA</sup>	78,52 ± 1,58 <sup>bcB</sup>	73,78 ± 1,42 <sup>abcC</sup>	67,77 ± 1,93 <sup>D</sup>	61,77 ± 2,57 <sup>E</sup>	55,20 ± 3,65 <sup>F</sup>	46,65 ± 3,89 <sup>G</sup>	38,08 ± 2,60 <sup>abH</sup>
TT-6	83,04 ± 1,93 <sup>abA</sup>	76,22 ± 0,90 <sup>cbB</sup>	71,26 ± 0,37 <sup>bcC</sup>	65,09 ± 1,60 <sup>D</sup>	57,95 ± 2,55 <sup>E</sup>	50,67 ± 4,19 <sup>F</sup>	42,74 ± 5,54 <sup>G</sup>	33,10 ± 5,69 <sup>abH</sup>

Ghi chú: ĐC: đối chứng; TT-1, TT-2, TT-3, TT-4, TT-5, TT-6: nghiệm thức bổ sung 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0µg/ml tinh dầu tương ứng. Các chữ cái viết thường (a, b, c) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 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).

**3.4. Tính toàn vẹn màng tinh trùng**

**Bảng 4. Tỷ lệ tính toàn vẹn màng tinh trùng khi bảo quản lạnh (%)**

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
ĐC	83,96 ± 1,06 <sup>bcA</sup>	77,73 ± 2,36 <sup>abB</sup>	68,88 ± 4,45 <sup>C</sup>	59,07 ± 6,48 <sup>D</sup>	50,49 ± 8,01 <sup>bE</sup>	42,74 ± 7,87 <sup>bF</sup>	34,01 ± 5,73 <sup>bcG</sup>	26,39 ± 3,83 <sup>bcH</sup>
TT-1	84,10 ± 0,57 <sup>bcA</sup>	78,79 ± 1,12 <sup>abB</sup>	71,85 ± 2,35 <sup>C</sup>	63,96 ± 2,47 <sup>D</sup>	55,8 ± 3,55 <sup>abE</sup>	47,89 ± 3,39 <sup>bcF</sup>	39,99 ± 4,45 <sup>abcG</sup>	30,69 ± 2,87 <sup>abcH</sup>
TT-2	85,10 ± 0,80 <sup>abA</sup>	79,51 ± 1,30 <sup>abB</sup>	73,02 ± 1,56 <sup>C</sup>	66,41 ± 2,17 <sup>D</sup>	58,98 ± 2,63 <sup>abE</sup>	51,08 ± 3,67 <sup>abF</sup>	41,82 ± 4,42 <sup>abG</sup>	32,75 ± 3,26 <sup>abcH</sup>
TT-3	86,40 ± 0,64 <sup>aA</sup>	80,01 ± 1,17 <sup>aB</sup>	73,75 ± 1,65 <sup>C</sup>	67,17 ± 1,91 <sup>D</sup>	60,51 ± 2,66 <sup>aE</sup>	54,29 ± 4,79 <sup>aF</sup>	45,73 ± 4,36 <sup>aG</sup>	36,21 ± 4,53 <sup>abH</sup>
TT-4	85,44 ± 1,40 <sup>abA</sup>	79,70 ± 2,73 <sup>abB</sup>	73,36 ± 3,50 <sup>C</sup>	66,84 ± 3,99 <sup>D</sup>	59,17 ± 4,62 <sup>abE</sup>	50,20 ± 4,63 <sup>abF</sup>	42,98 ± 3,57 <sup>abG</sup>	33,36 ± 1,98 <sup>abH</sup>
TT-5	84,30 ± 1,15 <sup>abcA</sup>	78,00 ± 1,58 <sup>abB</sup>	70,47 ± 2,06 <sup>C</sup>	63,45 ± 1,41 <sup>D</sup>	56,3 ± 1,65 <sup>abE</sup>	48,17 ± 1,71 <sup>abF</sup>	39,35 ± 3,11 <sup>abcG</sup>	30,08 ± 1,76 <sup>abcH</sup>
TT-6	82,66 ± 0,54 <sup>caA</sup>	75,66 ± 1,21 <sup>bbB</sup>	68,39 ± 1,39 <sup>C</sup>	59,78 ± 2,10 <sup>D</sup>	50,57 ± 1,62 <sup>abE</sup>	41,66 ± 1,59 <sup>bcF</sup>	30,65 ± 1,29 <sup>cdG</sup>	24,30 ± 0,64 <sup>cdH</sup>

Ghi chú: ĐC: đối chứng; TT-1, TT-2, TT-3, TT-4, TT-5, TT-6: nghiệm thức bổ sung 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0µg/ml tinh dầu tương ứng. Các chữ cái viết thường (a, b, c) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 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).

Chỉ tiêu tính toàn vẹn màng tinh trùng được ghi nhận kết quả tại bảng 4. Giá trị tính toàn vẹn màng tinh trùng ở các nghiệm thức 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. Đặc biệt, tính toàn vẹn màng tinh trùng của nghiệm thức bổ sung tinh dầu mức 1,5µg/ml được duy trì, ổn định cao và

có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng, thể hiện rõ qua giá trị Mean  $\pm$  SD trong thời gian bảo quản lạnh như: 86,40  $\pm$  0,64 so với 83,96  $\pm$  1,06 ngày thứ 1; 67,17  $\pm$  1,91 so với 59,07  $\pm$  6,48 ngày thứ 9; 54,29  $\pm$  4,79 so với 42,74  $\pm$  7,87 ngày thứ 15 và 36,21  $\pm$  4,53 so với 26,39  $\pm$  3,83 ngày thứ 21.

### 3.5. Khả năng bị oxy hóa của tinh trùng

**Bảng 5. Khả năng bị oxy hóa tinh trùng khi bảo quản lạnh (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	16,72 $\pm$ 1,45 <sup>bcA</sup>	30,35 $\pm$ 1,26 <sup>abB</sup>	87,46 $\pm$ 6,61 <sup>abC</sup>	133,53 $\pm$ 0,44 <sup>abD</sup>	163,06 $\pm$ 1,90 <sup>bE</sup>	202,13 $\pm$ 1,00 <sup>bF</sup>	290,80 $\pm$ 0,29 <sup>aG</sup>	352,54 $\pm$ 2,16 <sup>aH</sup>
TT-1	19,09 $\pm$ 0,64 <sup>abA</sup>	30,98 $\pm$ 0,48 <sup>abB</sup>	84,22 $\pm$ 6,03 <sup>abC</sup>	125,65 $\pm$ 0,79 <sup>bcD</sup>	155,03 $\pm$ 2,20 <sup>cE</sup>	192,61 $\pm$ 1,25 <sup>cF</sup>	267,70 $\pm$ 0,99 <sup>cG</sup>	328,17 $\pm$ 4,43 <sup>cH</sup>
TT-2	19,64 $\pm$ 2,09 <sup>abA</sup>	29,72 $\pm$ 1,93 <sup>abB</sup>	76,30 $\pm$ 6,18 <sup>bc</sup>	121,83 $\pm$ 6,93 <sup>cdD</sup>	149,53 $\pm$ 2,85 <sup>dE</sup>	184,62 $\pm$ 0,66 <sup>dF</sup>	251,75 $\pm$ 0,74 <sup>dG</sup>	316,22 $\pm$ 1,22 <sup>dH</sup>
TT-3	15,30 $\pm$ 0,73 <sup>cA</sup>	23,60 $\pm$ 1,41 <sup>cB</sup>	50,39 $\pm$ 3,94 <sup>cC</sup>	79,08 $\pm$ 0,87 <sup>dD</sup>	118,86 $\pm$ 2,39 <sup>eE</sup>	144,23 $\pm$ 4,60 <sup>eF</sup>	178,16 $\pm$ 5,10 <sup>eG</sup>	214,55 $\pm$ 3,18 <sup>eH</sup>
TT-4	18,83 $\pm$ 1,25 <sup>abA</sup>	29,13 $\pm$ 0,66 <sup>abB</sup>	78,57 $\pm$ 5,57 <sup>bc</sup>	115,04 $\pm$ 4,82 <sup>dD</sup>	154,17 $\pm$ 1,31 <sup>cdE</sup>	189,01 $\pm$ 1,09 <sup>cdF</sup>	254,80 $\pm$ 0,32 <sup>dG</sup>	321,43 $\pm$ 3,72 <sup>cdH</sup>
TT-5	19,69 $\pm$ 1,23 <sup>abA</sup>	31,71 $\pm$ 2,07 <sup>abB</sup>	87,39 $\pm$ 4,36 <sup>abC</sup>	122,01 $\pm$ 0,75 <sup>cdD</sup>	161,65 $\pm$ 2,12 <sup>bE</sup>	203,76 $\pm$ 1,01 <sup>bF</sup>	278,58 $\pm$ 2,50 <sup>bG</sup>	325,74 $\pm$ 1,55 <sup>cH</sup>
TT-6	20,33 $\pm$ 0,88 <sup>aA</sup>	34,84 $\pm$ 3,65 <sup>aB</sup>	95,11 $\pm$ 6,80 <sup>aC</sup>	135,12 $\pm$ 1,50 <sup>aD</sup>	168,63 $\pm$ 0,92 <sup>aE</sup>	213,05 $\pm$ 0,36 <sup>aF</sup>	290,41 $\pm$ 1,17 <sup>aG</sup>	343,74 $\pm$ 3,92 <sup>bH</sup>

*Ghi chú: ĐC: đối chứng; TT-1, TT-2, TT-3, TT-4, TT-5, TT-6: nghiệm thức bổ sung 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0µg/ml tinh dầu tương ứng. Các chữ cái viết thường (a, b, c) khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 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 ( $P < 0,05$ ).*

Kết quả tại bảng 5 cho thấy, mức độ bị oxy hóa của tinh trùng ở tất cả nghiệm thức tăng dần và có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) theo thời gian bảo quản lạnh. Tuy nhiên, có khác biệt khá rõ và có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) giữa nghiệm thức đối chứng không bổ sung tinh dầu so với nghiệm thức được bổ sung tinh dầu. Mức độ bị oxy hóa của tinh trùng ở nghiệm thức bổ sung tinh dầu với nồng độ 1,5µg/ml luôn thấp hơn và có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với các nghiệm thức được bổ sung tinh dầu ở nồng độ thấp (0,5 và 1,0µg/ml), nồng độ cao (2,0; 2,5 và 3,0µg/ml) và nghiệm thức đối chứng không bổ sung tinh dầu. Ngoài ra, khả năng bị oxy hóa tinh trùng của nghiệm thức bổ sung tinh dầu mức 1,5µg/ml luôn ổn định, thấp hơn và có ý nghĩa thống kê

( $P < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng được thể hiện rõ qua giá trị Mean  $\pm$  SD trong thời gian bảo quản lạnh như: 23,60  $\pm$  1,41 so với 30,35  $\pm$  1,26 ngày thứ 3; 79,08  $\pm$  0,87 so với 133,53  $\pm$  0,44 ngày thứ 9; 144,23  $\pm$  4,60 so với 202,13  $\pm$  1,00 ngày thứ 15 và 214,55  $\pm$  3,18 so với 352,54  $\pm$  2,16 ngày thứ 21. Có thể chứng minh việc bổ sung tinh dầu tía tô ở nồng độ 1,5µg/ml vào dung dịch bảo quản lạnh giúp tinh trùng gà được bảo vệ cao và hạn chế hoặc bị peroxid hóa lipid thấp hơn trong thời gian 21 ngày. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung tinh dầu Tía tô vào môi trường pha loãng đã cải thiện được chất lượng tinh trùng gà bảo quản lạnh. Nghiên cứu cho rằng nồng độ tinh dầu thấp tác dụng có lợi lên chất lượng tinh trùng của gà bảo quản lạnh, trong

khi tinh dầu ở nồng độ cao có tác động tiêu cực đến chất lượng tinh trùng. Đặc biệt, việc bổ sung nồng độ 1,5µg/ml tinh dầu tía tô vào môi trường pha loãng tinh trùng gà đã cải thiện thời gian sống của tinh trùng gà trong bảo quản lạnh. Sự tác động tích cực của tinh dầu tía tô đối với tinh trùng gà có thể do trong tinh dầu tía tô có chứa các hợp chất sinh học như perilla aldehyde, β-caryophyllene, (3Z,6E)-α-farnesene, D-limonene, β-linalool, perillic alcohol, eugenol. Các hoạt chất này đã được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa mạnh (Shereen và cs., 2020; Moreira-gomes và cs., 2021). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các công trình nghiên cứu trước đó về bổ sung chất kháng oxy hoá ngoại sinh có nguồn gốc từ thảo dược và từ hóa chất như chiết xuất từ trái oliu (Seyed và cs., 2016), tinh dầu dương kỳ thảo (Thananurak và cs., 2020), flavonoid quercetin (Tang và cs., 2021) đã cải thiện được chất lượng tinh trùng gà trong quá trình bảo quản. Ngoài ra, ở mức độ cao thì tinh dầu tía tô có ảnh hưởng đến sự sống của tinh trùng gà. Nguyên nhân có thể do các hợp chất có trong tinh dầu như estragole, eugenol, phytol, và β-caryophyllene. Các hoạt chất này đã được nghiên cứu khi bổ sung nồng độ không thích hợp sẽ gây phá vỡ cho màng tế bào và gây ngộ độc nội bào (Moreira-Gomes và cs., 2021; Espinosa-Ahedo và cs., 2022). Do đó, các chất trên có trong tinh dầu tía tô khi bổ sung ở nồng độ cao sẽ gây ảnh hưởng đến sự sống của tinh trùng. Bên cạnh tác dụng chống oxy hóa, nguồn năng lượng và khoáng chất từ tinh dầu có thể góp phần cải thiện chất lượng tinh trùng của gà. Trong nhiều nghiên cứu trước đây, người ta thấy rằng thành phần của tinh dầu có hàm lượng carbohydrate cao và các nguyên tố khoáng như canxi, magie, photpho, sắt, mangan, kẽm, crom, đồng (Akriti Dhyani và cs., 2019). Các chất này có thể hỗ trợ năng lượng cho hoạt động, duy trì cân bằng thẩm thấu và chức năng của tinh trùng (Smith và cs., 2018).

Ngoài ra, hàm lượng MDA được sản sinh ở các nghiệm thức có bổ sung tinh dầu ở các nồng độ khác nhau và đối chứng đều tăng dần trong quá trình bảo quản lạnh. Điều này cho thấy khả năng bị oxy hóa của tinh trùng gà chỉ thay đổi và tăng dần theo thời gian bảo quản lạnh và phù hợp với

nghiên cứu của Maia và cs. (2011) vì trong quá trình bảo quản, cả môi trường bảo quản và tinh trùng đều có thể bị oxy hóa. Sự giảm nồng độ MDA ở các nghiệm thức bổ sung tinh dầu từ nồng độ thấp đến cao có thể do sự gia tăng dần hàm lượng các hoạt chất sinh học kháng oxy hóa có trong tinh dầu Tía tô đã giúp bảo vệ tinh trùng trước sự stress oxy hóa trong quá trình bảo quản. Tuy nhiên, khi hàm lượng các chất kháng oxy hóa ở mức độ vượt ngưỡng tối ưu đã ảnh hưởng đến màng của tinh trùng và góp phần làm tăng tỷ lệ chết của tinh trùng nên tạo ra nhiều MDA. Vì thế, cần thiết bổ sung chất kháng oxy hóa vào môi trường pha loãng trước khi thực hiện bảo quản lạnh cho tinh trùng gà.

#### IV. KẾT LUẬN

Việc bổ sung tinh dầu tía tô vào môi trường pha loãng tinh dịch ở nồng độ 1,5µg/ml có tác dụng bảo vệ tinh trùng gà khi thực hiện bảo quản lạnh và góp phần cải thiện các chỉ tiêu về hoạt lực, tỷ lệ sống, tinh toàn vẹn màng và làm giảm khả năng bị oxy hóa của tinh trùng. Ngoài ra, cần tiếp tục thực hiện thêm chỉ tiêu phối đậu phôi để đánh giá khả năng thụ thai của tinh trùng và áp dụng cho phương pháp bảo quản trữ đông.

#### 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. Akriti Dhyani, Rajni Chopra & Meenakshi Garg, 2019. A review on nutritional value, functional properties and pharmacological application of perilla (*Perilla frutescens* L). *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(2): 4272.
3. 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
4. Đào Đức Thà, 2006. *Kỹ thuật thụ tinh nhân tạo*, Nxb Lao động-Xã hội.
5. Espinosa-Ahedo, B. A., Madrigal-Bujaidar, E., Sánchez-Gutiérrez, M., Izquierdo-Vega, J. A.,

- Morales-González, J. A., Madrigal-Santillán, E. O., & Álvarez-González, I., 2022. Potential protective effect of beta-caryophyllene against cadmium chloride-induced damage to the male reproductive system in mouse. *Reproductive Toxicology*, 110:19-30.
6. 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
  7. Blois Marsden, 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181:1199-1200.
  8. Maia M.S., Sicherle C.C., Bicudo S.D., L.Rodello & H.C. Azevedo, 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research*, 95 (2-3):144-149.
  9. Moghbeli Morteza, Hamid Kohram, Ahmaad Zare-Shahaneh, Mahdi Zhandi, Mohsen Sharafi, Mohammad Mehdi Nabi & 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.
  10. Moreira-Gomes, M. D., Machado, M. N., dos Santos Almeida, T., Barboza, P. D. P. A., Oliveira, L. F. S., ... & Zin, W. A., 2021. Eugenol mitigated acute lung but not spermatotoxicity of C60 fullerene emulsion in mice. *Environmental Pollution*, 269:116188.
  11. Nguyễn Thị Hoàng Lan, Bùi Quang Thuật, Lê Danh Tuyên & Nguyễn Thị Ngọc Duyên, 2015. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tía tô. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(2):245-250.
  12. Ohkawa H., N. Ohishi, & K. Yagi, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2):351-358.
  13. 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.
  14. Shahverdi A., Sharafi M., H. Gourabi, A.A. Yekta, V. Esmacili, 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.
  15. Shereen, M. S., Mahmoud, A., Mohamed, Z. B., & Mohamed, A., 2020. Effect of D-Limonene on the Age-Related Androgenic Changes in Male Rats. *The Medical Journal of Cairo University*, 88:599-609.
  16. 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.
  17. Smith, A. M. J., Bonato, M., Dzama, K., Malecki, I. A., & Cloete, S. W. P., 2018. Mineral profiling of ostrich (*Struthio camelus*) seminal plasma and its relationship with semen traits and collection day. *Animal Reproduction Science*, 193(8):98-106.
  18. Thomassen R., G. Sanson, A. Krogenæs, J.A. Fougner, K. Andersen Berg & W. Farstad, 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, 66(6 - 7):1645-1650.
  19. Trần Thanh Quỳnh Anh, Đỗ Thị Bích Thủy, Võ Thị Thu Hằng và 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. *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2020*, trang: 238-243.
  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. 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.
  22. Vui Nguyen Van, Samorn Ponchunchoovong, Sajeera Kupittayanant & Pakanit Kupittayanant, 2020. The potential of using *ocimum gratissimum* leaf essential oils as a supplement in extender to improve chilled canine sperm quality by assessing its antioxidant effects. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 11(8): 1338-1347.
- Ngày nhận: 11-11-2023  
 Ngày phản biện: 22-2-2024  
 Ngày đăng: 1-9-2024