บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง แผนการทดลองและปัจจัยการทดลอง

ใช้โคเนื้อลูกผสมพื้นเมืองเพศผู้เจาะกระเพาะหมัก จำนวน 4 ตัว จากนั้นสุ่มเข้าแผนการทดลองแบบ 2 x 2 factorial in 4 x 4 latin square design (น้ำหนักตัวเฉลี่ย 175±14.15 กิโลกรัม) โดยให้ช่วงเวลาการทดลอง (period) เป็นแถว (row) และสัตว์ทดลองเป็นคอลัมน์ (column) ทำการศึกษา 2 ปัจจัยคือ แหล่งของเมล็ดพืชน้ำมันที่ใช้ในสูตรอาหาร ได้แก่ 1) เมล็ดฝ้าย (WCS) และ 2) เมล็ดทานตะวัน (SFS) และระดับของไขมันในสูตรอาหาร ได้แก่ 1) 3% ไขมัน และ 6% ไขมัน ซึ่งมี 4 ทรีทเม้นต์ ดังนี้

T1 = เสริมเมล็ดฝ้ายที่มีระดับของกรดไขมัน 3 %

T2 = เสริมเมล็ดฝ้ายที่มีระดับของกรดไขมัน 6 %

T3 = เสริมเมล็ดทานตะวันที่มีระดับของกรดไขมัน 3 %

T4 = เสริมเมล็ดทานตะวันที่มีระดับของกรดไขมัน 6 %

แผนผังการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 : แผนผังงานทดลองแบบ 2 x 2 factorial in 4 x 4 latin square

ระยะทดลอง	สัตว์ (ตัวที่)			
	1	2	3	4
1	T1	T2	T3	T4
2	T2	T3	T4	T1
3	T3	T4	T1	T2
4	T4	T1	T2	T3

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สัตว์ทุกตัวถูกเลี้ยงในคอกขังเดี่ยวขนาด 2 x 4 เมตร ที่มีน้ำสะอาด แร่ธาตุก้อน และอาหารตลอดระยะเวลาทดลอง ซึ่งประกอบด้วย 4 ปัจจัย ดังรายละเอียด

3.2 อาหารและการเตรียมอาหารทดลอง

1) อาหารหยาบที่ให้ได้แก่ ฟางหมักยูเรีย (urea-treated rice straw 5%) ให้กินในปริมาณ 1.0 % ของน้ำหนักตัว (body weight)

2) อาหารข้นที่ใช้ ได้แก่เมล็ดฝ้ายและเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลักในอาหาร ซึ่งอาหารข้นจะให้ในปริมาณ 1.0 % body weight แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 : วัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารทดลอง

	Oilseed WCS		Oilseed SFS	
Ingredients	3% fat	6% fat	3% fat	6% fat
Rice pollard	17.00	7.00	18.00	15.00
Whole cottonseed	15.00	30.00	-	-
Sun flower seed	-	-	8.00	15.00
Soy bean meal 44% CP	15.00	9.00	18.00	15.00
Cassava chip	44.50	45.50	47.50	46.50
Urea	3.00	3.00	3.00	3.00
Molasses	3.00	3.00	3.00	3.00
Dicalcium phosphate	1.00	1.00	1.00	1.00
Limestone	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix	0.30	0.30	0.30	0.30
Sulfur	0.20	0.20	0.20	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition (by calculation)				
TDN, %	69.24	69.24	69.86	69.58
CP, %	20.38	20.04	20.57	20.46
EE, %	4.12	6.74	4.42	7.12

TDN = Total digestible nutrient ; CP = Crude protein ; EE = Ether extract

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.3 วิธีการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้

1) ระยะปรับสัตว์ก่อนเข้างานทดลอง (prelimimary period) ทำการนำสัตว์ทดลองเข้าเลี้ยงในคอกขังเดี่ยวเพื่อให้เกิดความเคยชินกับคอก อาหารและคนเลี้ยง นาน 30 วัน นอกจากนี้ทำการให้ยากำจัด

พยาธิภายนอกและภายในโดยใช้ยาฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (IVOMAX-F, 1%W/V Ivermectin and 1% Benzol alcohol) และฉีดวิตามิน AD_3E (Alfasan, Woerden Holland)

2) ระยะทดลอง (experimental period) ประกอบด้วย 4 รอบทดลอง (period) แต่ละรอบใช้เวลา 21 วัน ซึ่งแบ่งเป็น

วันที่ 1-14 วัน เป็นระยะเวลาปรับสัตว์ ในแต่ละวันทำการวัดปริมาณการกินได้ของอาหารหยาบ โดยชั่งอาหารหยาบที่ให้ในช่วงเช้าเวลา 07.00 น. และช่วงบ่าย 16.00 น. จากนั้นนำมาลบออกจากปริมาณอาหารหยาบที่เหลือในวันถัดไป ซึ่งจะให้ในปริมาณ 1.0 % ของน้ำหนักตัว จากนั้นมีการนำไปปรับเป็นวัตถุแห้ง (dry matter) ต่อไป

วันที่ 15-21 วัน (total collection) โดยให้สัตว์กินอาหารในปริมาณ 90% ทำการเก็บตัวอย่างมูลเป็น ระยะเวลาติดต่อกัน 7 วัน โดยวิธีเก็บทั้งหมด (total collection) ตลอดทั้งวัน เริ่มทำการเก็บมูลตั้งแต่เวลา 09.30 น. ใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิทและเก็บต่อเนื่องไปจนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง (ณ เวลา 09.30 น. ของวันถัดไป) จากนั้นนำมูลที่เก็บได้ทั้งหมดมาชั่งน้ำหนักและทำการจดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ จากนั้นทำการสุ่มมูลประมาณ 1 กิโลกรัม นำไปแช่เย็นที่ – 5 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดระยะเก็บตัวอย่างในแต่ละรอบของการทดลอง จึงจะนำเอาตัวอย่างมูลที่แช่เย็นไว้ออกมาผสมกัน แล้วทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลอีกครั้ง โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนแรก สุ่มเก็บ 2 กิโลกรัม จากนั้นนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักฎแห้ง

ส่วนที่ 2 สุ่มเก็บ 1 กิโลกรัม แล้วนำไปแช่เย็นไว้ที่ – 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป จากนั้นทำการคำนวณค่าความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะต่างๆตามวิธีการของ Schnieder and Flatt (1975) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง} = 100 \times \frac{\text{(ปริมาณวัตถุแห้งที่กิน - ปริมาณวัตถุแห้งที่ขับออกในมูล)}}{\text{(ปริมาณวัตถุแห้งที่กิน)}}$$

เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของโภชนะ =100 x (ปริมาณวัตถุแห้งที่กิน x โภชนะในอาหาร)–(น้ำหนักมูลปรับแห้ง x โภชนะในมูล) / ปริมาณวัตถุแห้งที่กิน x โภชนะในอาหาร)

3) ทำการชั่งน้ำหนักโคในช่วงก่อนเข้างานทดลองและวันสุดท้ายของแต่ละ period โดยทำการชั่งน้ำหนักโคก่อนให้อาหารในตอนเช้า นำค่าที่ได้มากำหนดปริมาณอาหารหยาบและอาหารข้นที่ให้ เพื่อคำนวณปริมาณการกินได้ในหน่วยกิโลกรัมต่อวัน (kg/d) และกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว $^{0.75}$(g/kgW$^{0.75}$)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.4 การเก็บข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

1) สุ่มเก็บ rumen fluid ในชั่วโมงที่ 0 3 6 ชม. หลังให้อาหารและตัวอย่างที่ได้นำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และกรองด้วยผ้าสะอาด ทำการเติม 5 ml of H_2SO_4 solution (1M) ผสมกับ 50 ml of rumen fluid จากนั้นนำไป centrifuged at 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บสารละลายที่ได้ (supernatant) ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (ammonia-nitrogen, NH_3-N ด้วยวิธีการกลั่นตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965) และนำของเหลวอีกส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (volatile fatty acid) ได้แก่ กรดอะซิติก, กรดโพรพิออนิก และกรดบิวทีริก โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2) สุ่มเก็บอาหารหยาบแห้งและอาหารข้นทำการสุ่มเก็บ 7 วันสุดท้ายของแต่ละช่วงทดลอง (period) จากนั้นแบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก นำมาอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของวัตถุแห้ง ส่วนที่สอง นำมาอบที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของโภชนะต่างๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM) เถ้า (ash) โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีการของ AOAC (1984) และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของเยื่อใย ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลางหรือผนังเซล (neutral detergent fiber, NDF) ลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) และ ลิกนิน (acid detergent lignin, ADL) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970)

3) เก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 20 ของแต่ละช่วงการทดลอง (period) โดยเจาะที่เส้นเลือดดำบริเวณลำคอ (jugular vein) ในชั่วโมงที่ 0 3 6 หลังจากการให้อาหารในช่วงเช้า จากนั้นนำเลือดมาปั่นเหวี่ยงใส (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที แยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นซีรั่ม (serum) เพื่อวิเคราะห์หา triglyceride, cholesterol, low density lipoprotein (VLDL) และ high density lipoprotein (HDL)

4) แยกกลุ่ม bacteria โดยวิธี roll- tube technique (Hungate, 1969) ดังรายละเอียด

นำ rumen content ที่ทราบน้ำหนักประมาณ 10 มิลลิลิตร (ในชั่วโมงที่ 0 3 6)บรรจุในถุงพลาสติกใส นำมาเติม anaerobic dilution ที่ผสม tween 80 ให้ได้สัดส่วน rumen content : anaerobic dilution เท่ากับ 1:4 (w/v) จากนั้นนำมาแทนที่ก๊าซออกซิเจนโดยผ่านด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจับถุงเขย่าอย่างแรงเพื่อให้จุลินทรีย์ที่เกาะกับเศษอาหารหลุดออกมากระจายใน solution จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ทำการเจือจาง rumen content ให้ความเจือจางลดลงระดับละ 10 เท่า ตามลำดับตั้งแต่ 10^{-1} , 10^{-2} ถึง 10^{-9} นำไปคพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ roll- tube technique ตามวิธีการของ Hungate (1969) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียได้แก่ amylolytic bacteria, cellulolytic bacteria และ

proteolytic bacteria ตามรายละเอียดใน Hobson (1969) เพื่อนับ colonies ของแบคทีเรียที่เจริญ ซึ่งระดับความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมีดังนี้ amylolytic bacteria และ proteolytic bacteria คือ 10^{-6} ส่วน cellulolytic bacteria คือ 10^{-9} โดยปริมาตรตัวอย่างที่ใช้แต่ละระดับความเจือจางได้แก่ 0.50 มิลลิลิตร สำหรับวิธีการเพาะเชื้อจะใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มดูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นลงเพื่อไล่อากาศในเข็ม จากนั้นจึงเสียบลงบนขวด rumen content เพื่อดูดตามระดับความเจือจางและปริมาตรที่กำหนด ใส่ลงในขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะแต่ละกลุ่ม จากนั้นนำขวดอาหารผสม rumen content ไปทำ roll tube โดยนำไปกลิ้งบนถาดน้ำแข็งเพื่อให้อาหารวุ้นแข็งตัวรอบขวด ใช้ผ้าซับน้ำรวบให้แห้ง นำไปวางบน rack โดยคว่ำปากขวดลงด้านล่าง ทำวิธีการเช่นนี้ในทุกกลุ่มแบคทีเรีย จากนั้นนำขวดที่ทำ roll tube แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างกันในแต่ละกลุ่มดังนี้

- amylolytic bacteria เป็นเวลา 3 วัน
- proteolytic bacteria เป็นเวลา 5 วัน
- cellulolytic bacteria เป็นเวลา 21 วัน

ทำการตรวจนับจำนวน colonies ของแบคทีเรียตามระยะเวลาที่บ่มในแต่ละกลุ่มแบคทีเรียจนครบทุก period

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ 2 x 2 factorial in 4 x 4 Latin Square Design วิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติแบบ analysis of variance โดยใช้ Proc GLM (SAS, 1985) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1960)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.6 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทำงานทดลองวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2551 ถึง 1 มกราคม พ.ศ. 2552 รวมระยะเวลา 365 วัน

3.7 สถานที่ทำการวิจัย

1) สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2) หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3) ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร