

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยการวิจัยจะดำเนินการเป็นไปตามแผนดังนี้

#### 1. สัตว์ทดลอง

- 3.1.1 ใช้โคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองเพศเมียอายุ 2.5 ปี จำนวน 10 ตัว เมื่อเริ่มทำการทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $250 \pm 20$  กิโลกรัม
- 3.1.2 สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิภายในโดยการฉีด Ivermectin ขนาด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ก่อนเข้าทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์
- 3.1.3 สัตว์ทุกตัวได้รับวิตามิน A, D<sub>3</sub> และ E ประกอบด้วยวิตามินเอ 50,000 ใยูต่อมิลลิกรัม วิตามิน D<sub>3</sub> 10,000 ใยูต่อมิลลิกรัม และวิตามิน E 10 ใยูต่อมิลลิกรัม โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ก่อนเข้าทดลอง 1 สัปดาห์
- 3.1.4 สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยวมีรางอาหาร และรางน้ำสะอาดแยกเฉพาะตัว และมีน้ำให้กินตลอดเวลาในแต่ละคอก

#### 2. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

- 3.2.1 หัวมันสำปะหลัง
- 3.2.2 กากมันสำปะหลัง
- 3.2.3 เปลือกถั่วมันสำปะหลัง
- 3.2.4 เปลือกทุเรียน
- 3.2.4 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
- 3.2.5 กากน้ำตาล
- 3.2.6 ยูเรีย
- 3.2.7 เครื่องสับ
- 3.2.8 กระจอบ และถุงพลาสติก

- 3.2.9 ถังหมัก (100 ลิตร, 20 ลิตร)
- 3.2.10 pH- meter
- 3.2.11 เครื่องชั่ง (60 กิโลกรัม)
- 3.2.12 สายชั่งน้ำหนัก
- 3.2.13 เครื่องให้ออกซิเจน (Air Pump)
- 3.2.14 กล้องจุลทรรศน์
- 3.2.15 เครื่องอบตัวอย่าง (Hot Air Oven)
- 3.2.16 สารละลายฟอร์มาลิน
- 3.2.17 สาร 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 3.2.18 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 3.2.19 Syringe และเข็มเบอร์ 18 ขนาด 1, 1.5 นิ้ว
- 3.2.20 อุปกรณ์ทำความสะอาด (ไม้กวาด, พู่)
- 3.2.21 กล้องโฟม
- 3.2.22 ซองบังคับสัตว์
- 3.2.23 กล้องถ่ายรูป
- 3.2.24 สายวัดน้ำหนักโค

### 3. กรรมวิธีการเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังและเปลือกทุเรียน

3.1 ชั่งน้ำตาลทรายแดงจำนวน 1 กิโลกรัม (1 ถุง) ผสมในน้ำสะอาดจำนวน 10 ลิตร ละลายให้เข้ากัน และเติมผงยีสต์ปริมาณ 500 กรัม (1 ก้อน) ลงในถังพลาสติกขนาด 20 ลิตร และทำการละลายผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที (A)

3.2 เตรียมสารละลายกากน้ำตาล และยูเรียเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ (Medium) (B) ดังนี้

3.2.1 เติมน้ำสะอาดจำนวน 90 ลิตร ลงในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร ที่เตรียมไว้ ให้ครบจำนวน 10 ถึง

3.2.2 ชั่งยูเรีย จำนวน 4 กิโลกรัม และ กากน้ำตาลจำนวน 5 ลิตร เเทลงในถัง พลาสติกและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในถังที่เตรียมไว้จำนวน 10 ถึงจนครบ

3.3 เมื่อครบเวลาที่กำหนดหลังการละลายยีสต์ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ทำการเทยีสต์ที่ เลี้ยงไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ (A)+(B) ทำการให้ออกซิเจน (Air Pump) ตลอดระยะเวลา

หลังจากนั้นปล่อยให้ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (คัดแปลงจาก กฤษณา และคณะ, 2551; Khampa *et al.*, 2009)

3.4 ทำการบดสับหัวมันสำปะหลังสดและเปลือกทุเรียน บรรจุลงในกระสอบที่มี ปริมาตรไม่เกิน 30 กิโลกรัม ทั้งนี้ทำการซ้อนถุงพลาสติกสีดำ (ถุงขบะปริมาตร 30×40) อยู่ภายใน ทำการบรรจุจำนวน 30 กิโลกรัมต่อกระสอบ ในสัดส่วน 50:50 ของแต่ละทรีทเมนต์ ตลอดจนทำการบรรจุเปลือกถั่วมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลังลงในกระสอบ เช่นเดียวกัน

3.5 เติมน้ำหมักยีสต์ปริมาตร 5 ลิตร ทำการตวงน้ำหมักยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ลิตร ทำการเทลงในกระสอบโดยใช้ไม้เสียบที่ตำแหน่งตรงกลางกระสอบเพื่อให้ น้ำยีสต์ ที่เตรียมไว้กระจายไปยังกระสอบ หลังจากนั้นใช้เชือกมัดกระสอบปิดให้สนิทและบ่มหมักไว้ เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปเลี้ยงโคต่อไป

#### 4. แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบประชากรสองกลุ่มที่อิสระต่อกัน (Pair t-test) โดยสุ่มสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็นหนึ่งกลุ่มการทดลอง มีโคจำนวน 10 ตัวต่อกลุ่ม ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เพื่อทดสอบ อาหาร 2 ทรีทเมนต์ โคมีน้ำหนักตัวเริ่มต้นเฉลี่ย  $250 \pm 20$  กิโลกรัม ซึ่งมีทรีทเมนต์ (Treatment) ที่ทดสอบดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 : เปลือกถั่วมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์

ทรีทเมนต์ที่ 2 : หัวมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับเปลือกทุเรียนหมักยีสต์

หมายเหตุ : 1. สัตว์ทุกตัวทั้งสองกลุ่มจะได้รับการเสริมทรีทเมนต์ปริมาตร 2 % ของ น้ำหนักตัว ร่วมกับอาหารหยาบคือฟางข้าวกินอย่างเต็มที่ (*Ad libitum*) และปล่อยให้เดิน เทาะเล็มในแปลงหญ้าธรรมชาติ

2. แผนการทดลองแบบ (Pair t-test) จะใช้สัตว์ทดลองในกลุ่มเดิม เพื่อทำการ ทดลองในช่วงที่ 2 ที่ได้รับอาหารทดสอบคือ หัวมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับ เปลือกทุเรียนหมักยีสต์

ตารางที่ 7 แสดงแผนผังการทดลอง (Lay Out)

ทรีทเมนต์ที่ 1 (T1)	ทรีทเมนต์ที่ 2 (T2)
A1	A1
A2	A2
A3	A3
A4	A4
A5	A5
A6	A6
A7	A7
A8	A8
A9	A9
A10	A10

หมายเหตุ : A (T1) หมายถึง สัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับทรีทเมนต์ คือ เปลือกถั่วมันสำปะหลังหมักยีสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกากมันสำปะหลังหมักยีสต์ 50 เปอร์เซ็นต์

A (T2) หมายถึง สัตว์ทดลองกลุ่มเดิมที่ได้รับทรีทเมนต์ คือ หัวมันสำปะหลังหมักยีสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเปลือกทุเรียนหมักยีสต์ 50 เปอร์เซ็นต์

## 5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 ก่อนเข้าทำการทดลองโคทุกตัวจะได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายใน และภายนอก และทำการฉีดวิตามิน AD<sub>3</sub>E

5.2 ระยะเวลาปรับสัตว์ก่อนเข้าทดลอง ให้สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางเป็นอาหารหยาบแบบเต็มที (*Ad libitum*) และให้อาหารข้น ตามทรีทเมนต์ที่สัตว์ได้รับในคอกทดลอง มีน้ำสะอาดให้สัตว์ได้กินตลอดเวลาเป็นเวลา 15 วัน เพื่อเป็นการปรับสัตว์ให้คุ้นเคยกับอาหาร และคอกทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 4

5.3 สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบ (Pair t-test) โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับทรีทเมนต์ตามที่กำหนด โดยช่วงการทดลองมีระยะเวลา 120 วัน

5.4 ขณะที่เข้าทำการทดลองสัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับการเสริมทรีทเมนต์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งให้ช่วงเช้าเวลาประมาณ 08.00 นาฬิกา และช่วงเย็นเวลา

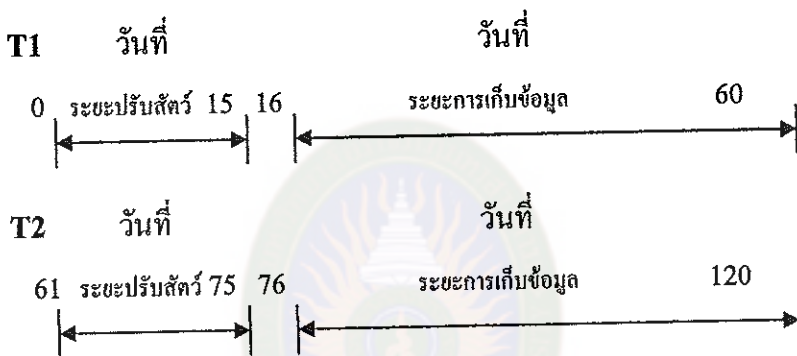
ประมาณ 17.00 นาฬิกา ร่วมกับอาหารหยาบฟางข้าว กินอย่างเต็มที่ (*Ad libitum*) และปล่อยเดิน  
 ทะเล่ในแปลงหญ้าธรรมชาติในเวลาประมาณ 10.00 นาฬิกา ถึงเวลาประมาณ 16.30 นาฬิกา

5.5 บันทึกปริมาณการให้อาหารการหาปริมาณการกินได้ในแต่ละวัน โดยทำการจด  
 บันทึกปริมาณอาหารที่กินให้และอาหารที่เหลือทั้งเช้าและเย็นทุกวัน

การกิน ได้ต่อวัน (น้ำหนักสด)

$$= [\text{อาหารให้ตอนเช้า (น้ำหนักสด)} - \text{อาหารเหลือตอนเช้า (น้ำหนักสด)}] +$$

$$[\text{อาหารให้ตอนเย็น (น้ำหนักสด)} - \text{อาหารเหลือตอนเย็น (น้ำหนักสด)}]$$



แผนภาพที่ 4 แสดงช่วงระยะของการดำเนินการวิจัยและการเก็บข้อมูล

หมายเหตุ: 1. ระยะการปรับสัตว์ 15 วัน ก่อนเข้าการทดลองทั้ง 2 ทรีทเมนต์ที่ทดสอบ

2. ระยะของการบันทึกบันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสัตว์ การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อ  
 หาความเข้มข้นของยูเรียในโตรเจนในกระแสเลือด และการสุ่มของเหลวเพื่อหาความเข้มข้น  
 แอมโมเนียในโตรเจนในกระเพาะหมัก เก็บทุก 45 วัน หรือช่วงวันที่ 16 และ วันที่ 60 ในทรีท  
 เมนต์ที่ 1 และ ทุก 45 วัน หรือช่วงวันที่ 76 และ วันที่ 120 ในทรีทเมนต์ที่ 2 รวมทั้งหมด 4 ครั้ง  
 ตลอดช่วงการทดลอง 120 วัน

5.6 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกถั่วลิสงสกัดหยาบ คากมัน  
 สกัดหยาบ คากมันสกัด เปลือกทุเรียนหมักยีสต์ และฟางข้าว ได้แก่  
 วัตถุแห้ง, ความชื้น, โปรตีนหยาบ และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) และเอื่อใยได้แก่ ผนัง  
 เซลล์ (neutral detergent fiber; NDF), ลิกนินและเซลลูลูโลส ลิกนิน (acid-detergent fiber;  
 ADF) ตามวิธีการของ Van Soest (1994)

## 6. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

### 6.1 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์โดยใช้สายวัดน้ำหนักโคก่อนเข้าช่วงการทดลอง (Period) และทำการทดลอง (ดังแสดงในแผนภาพที่ 4) หลังจากอยู่ในคอกทดลองของทุกระยะการทดลอง ทั้งหมด 4 ครั้ง เพื่อใช้ในการคำนวณน้ำหนักตัวเป็นเกณฑ์คำนวณตลอดระยะเวลาเลี้ยงหรือน้ำหนักเพิ่มต่อวัน สามารถนำมาหาค่าอัตราการเจริญเติบโต (Average Daily Gain; ADG) และ ค่าปริมาณการกินได้ (Feed Intake) ของสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงการทดลองของสัตว์ที่ทดลองได้ (ประไพพรรณ, 2553) ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (ADG)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวสุดท้าย-น้ำหนักเริ่มต้น (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}} \times \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

### 6.2 การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด

เริ่มทำการเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงท้ายของการทดลอง โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังการให้อาหาร 2 ชั่วโมง ของแต่ละช่วงการทดลอง (ดังแสดงในภาพที่ 4) ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (Jugular vein) จากนั้นนำเลือดที่เก็บได้ลงในกล่องโฟมเพื่อที่จะนำมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) และเก็บส่วน Plasma เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียไนโตรเจน (blood urea nitrogen, BUN) ตามวิธีของ Talke and Schubert (1965)

### 6.3 การสุ่มของเหลวเพื่อหาความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจน (NH<sub>3</sub>-N)

ในกระเพาะหมัก

สุ่มวัดความเป็นกรด-ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักโดยใช้ pH meter (HANNA instruments HI 8424 microcomputer) และปรับให้มีค่า pH ประมาณ < 3 ด้วยการเติม 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ในสัดส่วน 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ต่อของเหลวในกระเพาะหมัก ในสัดส่วน 1 ต่อ 10 เพื่อหยุด

การเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใส แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965)

#### 6.4 การศึกษาต้นทุนค่าอาหาร (Feed Cost)

ต้นทุนค่าอาหาร (Feed Cost) เป็นค่าที่ใช้ในการประเมินคุณค่าของอาหารในทางเศรษฐกิจ เพื่อจะทราบ ค่าใช้จ่ายไปเฉพาะค่าอาหาร ที่ทำให้โคมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 1 กิโลกรัม (ประไพพรรณ, 2553) ดังนี้

$$\text{ต้นทุนค่าอาหารต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน} \times \text{ราคาอาหารต่อ กิโลกรัม}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น}}$$

#### 7. การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดย Analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลอง (Pair T-Test) โดยใช้ Proc.TTEST (SAS, 1998) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์