บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยการวิจัยจะดำเนินการเป็นไปตามแผนดังนี้

1. สัตว์ทดลอง

1.1 ใช้โคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองเพศเมียอายุ 2 ปี จำนวน 9 ตัว เมื่อเริ่มทำการทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 250±20 กิโลกรัม

1.2 สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิภายในโดยการฉีด Ivermectin ขนาด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ก่อนเข้าทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์

1.3 สัตว์ทุกตัวได้รับไวตามิน AD_3E ประกอบด้วยไวตามินเอ 50,000 ไอยูต่อมิลลิลิตร ไวตามิน D_3 10,000 ไอยูต่อมิลลิลิตร และไวตามิน E 10 ไอยูต่อมิลลิลิตร โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ก่อนเข้าทดลอง 1 สัปดาห์

1.4 สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยวมีรางอาหาร และรางน้ำสะอาดแยกเฉพาะตัว และมีน้ำให้กินตลอดเวลาในแต่ละคอก

2. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

2.1 กากมันสำปะหลัง

2.2 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

2.3 น้ำมันปาล์ม

2.4 กากน้ำตาล

2.4 ยูเรีย

2.5 กระสอบ และถุงพลาสติกดำ

2.6 ถังหมัก (100 ลิตร, 20 ลิตร)

2.7 pH- meter

2.8 เครื่องชั่ง (60 กิโลกรัม)

2.9 สายวัดน้ำหนักโค

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.10 เครื่องให้ออกซิเจน (Air Pump)

2.11 กล้องจุลทรรศน์

2.12 เครื่องอบตัวอย่าง (Hot Air Oven)

2.13 สารละลายฟอร์มาลิน

2.14 สาร 1M H_2SO_4

2.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง

2.16 Syringe และเข็มเบอร์ 18 ขนาด 1, 1.5 นิ้ว

2.17 อุปกรณ์ทำความสะอาด (ไม้กวาด, พลั่ว)

2.18 กล่องโฟม

2.19 ซองบังคับสัตว์

2.20 กล้องถ่ายรูป

2.21 สายวัดน้ำหนักโค

3. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อยีสต์ Baker Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

การเตรียมน้ำยีสต์

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 + ยูเรียเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ (Medium) ดังนี้ (B)

3.2.1 เติมน้ำสะอาดจำนวน 90 ลิตรลงในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตรที่เตรียมไว้ให้ครบจำนวน 10 ถัง

3.2.2 ชั่งยูเรีย จำนวน 4 กิโลกรัม และ กากน้ำตาลจำนวน 5 ลิตร เทลงในถังพลาสติก และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในถังที่เตรียมไว้จำนวน 10 ถังจนครบ

3.3 เมื่อครบเวลาที่กำหนดหลังการละลายยีสต์ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ทำการเทยีสต์ที่เลี้ยงไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ (A)+(B) ทำการให้ออกซิเจน (Air Pump) ตลอดระยะเวลา หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (ดัดแปลงจาก กฤษฎา และคณะ, 2551; Khampa *et al.*, 2009)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การเตรียมน้ำยีสต์ร่วมกับน้ำมันปาล์ม

จากการเตรียมน้ำยีสต์เหมือนข้อ 3.3.1, 3.3.2 และ3.3.3 ของกระบวนการเตรียมน้ำยีสต์ร่วมกับน้ำมันปาล์ม จะทำในขั้นตอนที่ 3.3.3 กล่าวคือ เมื่อครบเวลาที่กำหนดหลังการละลายยีสต์ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ทำการเทยีสต์ที่เลี้ยงไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ (A), ในถังที่เตรียมน้ำสารละลายกากน้ำตาลและยูเรีย (B), จากนั้นทำการชั่งน้ำมันปาล์มในอัตราส่วนน้ำมันปาล์ม 1 กิโลกรัม (ทรีทเมนต์ที่ 2) และ น้ำมันปาล์ม 2 กิโลกรัม (ทรีทเมนต์ที่ 3) ต่อปริมาณน้ำ 100 ลิตร และปล่อยทิ้งไว้ทำการให้ออกซิเจน (Air Pump) ตลอดระยะเวลา หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ 1 วันเพื่อให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน

ขั้นตอนการผลิตกากมันหมักยีสต์

กากมันสำปะหลังที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานแป้งมันคาร์กิลล์สยาม อ.บรบือ จ.มหาสารคาม ทำการบรรจุในกระสอบ 30 กิโลกรัมต่อกระสอบ โดยมีถุงพลาสติกดำซ้อนอยู่ด้านในกระสอบ จากนั้นทำการตวงน้ำหมักยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาณ 5 ลิตร ทำการเทลงในกระสอบโดยใช้ไม้เสียบที่ตำแหน่งตรงกลางกระสอบเพื่อให้น้ำยีสต์ที่เตรียมไว้ถูกดูดซึม และกระจายไปทั้งกระสอบ หลังจากนั้นใช้เชือกรัดกระสอบปิดให้สนิทและหมักไว้เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปเลี้ยงสัตว์ต่อไป

4. แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ใช้โคเนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองเพศเมียจำนวน 9 ตัว เป็นหน่วยทดลอง (Experimental Unit) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โคมีน้ำหนักตัวเริ่มต้นเฉลี่ย 250±20 กิโลกรัม ซึ่งปัจจัยทดลอง (Treatment) คือระดับการให้อาหารที่ทดสอบดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 : กากมันสำปะหลังหมักยีสต์

ทรีทเมนต์ที่ 2 : กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์

ทรีทเมนต์ที่ 3 : กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับน้ำมันปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ : สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับการเสริมทรีทเมนต์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวร่วมกับอาหารหยาบฟางข้าว กินอย่างเต็มที่ (*Ad libitum*) และปล่อยเดินแทะเล็มในแปลงหญ้าธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 8 แสดงแผนผังการทดลอง (Lay Out)

Rep	Treatment		
1	T1	T3	T3
2	T2	T1	T3
3	T2	T2	T1

หมายเหตุ : T1 หมายถึง สัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับทรีทเมนต์ที่ 1 คือ กากมันสำปะหลังหมักยีสต์

T2 หมายถึง สัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับทรีทเมนต์ที่ 2 คือ กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์

T3 หมายถึง สัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับทรีทเมนต์ที่ 3 คือ กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ร่วมกับน้ำมันปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 ก่อนเข้าการทดลอง โคทุกตัวจะได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายใน และภายนอก และทำการฉีดไวตามิน AD_3E

5.2 ระยะปรับสัตว์ก่อนเข้าทดลอง ให้สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางเป็นอาหารหยาบแบบเต็มที่ (*Ad libitum*) และให้อาหารข้นตามทรีทเมนต์ที่สัตว์ได้รับในคอกทดลอง มีน้ำสะอาดให้สัตว์ได้ กินตลอดเวลาเป็นเวลา 15 วัน เพื่อเป็นการปรับสัตว์ให้คุ้นเคยกับอาหารและคอกทดลอง

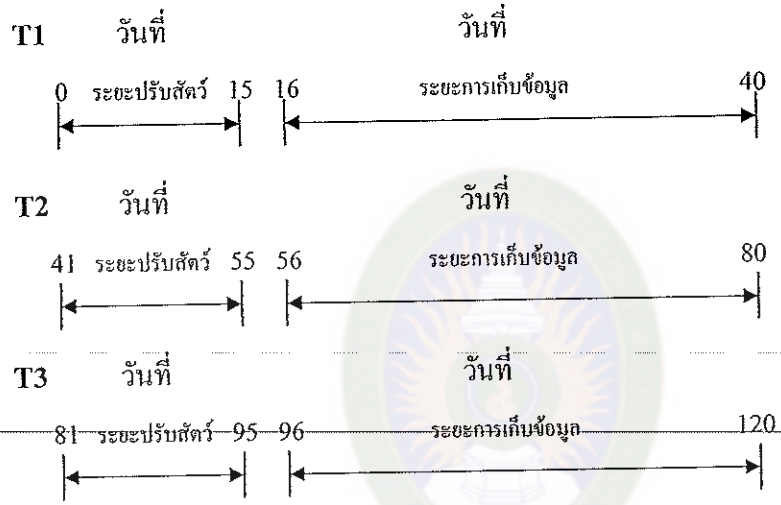
5.3 สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับทรีทเมนต์ตามที่กำหนด โดยมีระยะเวลาในการทดลอง 120 วัน

5.4 ขณะที่เข้าทำการทดลองสัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับ การเสริมทรีทเมนต์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งให้ช่วงเช้าเวลาประมาณ 08.00 นาฬิกา และช่วงเย็นเวลาประมาณ 17.00 นาฬิกา ร่วมกับอาหารหยาบฟางข้าว กินอย่างเต็มที่ (*Ad libitum*) และปล่อยเดินแทะเล็มในแปลงหญ้าธรรมชาติในเวลาประมาณ 10.00 นาฬิกา ถึงเวลาประมาณ 16.30 นาฬิกา

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5.5 บันทึกปริมาณการให้อาหารการหาปริมาณการกินได้ในแต่ละวันโดยทำการจดบันทึกปริมาณอาหารที่ให้ และอาหารที่เหลือทั้งเช้าและเย็นทุกวัน

การกินได้ต่อวัน(น้ำหนักสด) = [อาหารให้ตอนเช้า (น้ำหนักสด)-อาหารเหลือตอนเช้า (น้ำหนักสด)] +
[อาหารให้ตอนเย็น (น้ำหนักสด)-อาหารเหลือตอนเย็น (น้ำหนักสด)]



แผนภาพที่ 4 แสดงช่วงระยะของการดำเนินการวิจัย และการเก็บข้อมูล

หมายเหตุ: 1. ระยะการปรับสัตว์ 15 วัน ก่อนเข้าการทดลองทั้ง 3 ทรีทเมนต์ที่ทดสอบ

2. ระยะของการบันทึกบันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสัตว์ การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด และการสุ่มของเหลวเพื่อหาความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมัก เก็บทุก 25 วัน หรือช่วงวันที่ 16, 40, 56, 80, 96 และวันที่ 120 ในทรีทเมนต์ที่ 1, 2 และ 3 รวมทั้งหมด 6 ครั้ง ตลอดช่วงการทดลอง 120 วัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

6 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

6.1 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์โดยใช้สายวัดน้ำหนักโคก่อนเข้าช่วงการทดลอง (Period) และท้ายการทดลอง (ดังแสดงในภาพที่ 5) หลังจากอยู่ในคอกทดลองของทุกระยะการทดลอง ทั้งหมด 4 ครั้ง เพื่อใช้ในการคำนวณน้ำหนักตัวเป็นเกณฑ์คำนวณตลอดระยะการเลี้ยงหรือน้ำหนักเพิ่มต่อวัน สามารถนำมาหาค่าอัตราการเจริญเติบโต (Average Daily Gain; ADG) และ ค่าปริมาณการกินได้ (Feed Intake) ของสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงการทดลองของสัตว์ที่ทดลองได้ ตามวิธีของ (ประไพพรรณ, 2553) ดังนี้

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

$$\text{ปริมาณการกินได้ (Feed Intake)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กก.)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

6.2 การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด

เริ่มทำการเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงท้ายของการทดลองโดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังการให้อาหาร 2 ชั่วโมง ของแต่ละช่วงการทดลอง (ดังแสดงในภาพที่4) ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (Jugular Vein) จากนั้นนำเลือดที่เก็บได้ลงในกล่องโฟมเพื่อที่จะนำมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) และเก็บส่วน Plasma เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียในเลือด (Blood Urea Nitrogen, BUN) ตามวิธีของ Talke and Schubert (1965)

6.3 การสุ่มของเหลวเพื่อหาความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) ในกระเพาะหมัก

สุ่มวัดความเป็นกรด–ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักโดยใช้ pH meter (HANNA Instruments HI 8424 Microcomputer) และปรับให้มีค่า pH ประมาณ < 3 ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1 M H_2SO_4 1 ส่วนต่อของเหลวในกระเพาะหมัก 10 ส่วน เพื่อหยุดการ

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใส แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N)โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965)

6.4 การศึกษาจำนวนแบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา โดยวิธีนับตรง (Direct count)

สุ่มของเหลวในกระเพาะหมัก และผสมในสารละลายฟอร์มาลีนในสัดส่วน Rumen Fluid : Formalin = 1 : 9 แล้วนำไปนับจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา เพื่อคำนวณหาจำนวนของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก ตามวิธีของ Galyean (1989)

6.5 การศึกษาต้นทุนค่าอาหาร (Feed cost)

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

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

7. การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดย Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลอง CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1998)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY