

บทนำ

ความเครียดในโคมีทั้งสาเหตุจากสิ่งแวดล้อมและปัจจัยภายในตัวโคตนเอง สาเหตุจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมสามารถแก้ปัญหาได้จากการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมในอยู่สบายได้สำหรับโค แต่สาเหตุใหญ่คือปัจจัยภายในร่างกายซึ่งโคเป็นสัตว์ให้น้ำนมการตอบสนองต่อความเครียดจึงไวเป็นพิเศษ การลดความเครียดจากร่างกายโคมักมีสาเหตุหลักเกิดจากการกินอาหาร อาหารเมื่ออยู่ในกระเพาะหมักจะมีการหมักย่อย ซึ่งทำให้เกิดความร้อนจากการหมักย่อยอาหารขึ้น และจากการเกิด metabolism ของสารอาหารที่ได้รับการนำไปใช้ของร่างกาย การหาเทคนิคจัดการด้านอาหารจะช่วยลดความร้อนที่ทำให้เกิดความเครียดได้เช่นการจัดการสมดุลของกระเพาะหมัก การรักษาระดับกรดต่างในกระเพาะ การลดการเกิดก๊าซมีเทน การปรับปรุงการย่อยได้อาหารที่กินด้วยการใช้สารเสริมมีหลายแบบ กลุ่ม exogenous fibrolytic enzyme หรือการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพร หรือการใช้พืชสมุนไพรแบบไม่สกัดผสมในอาหารสัตว์ จะส่งผลต่อการปรับปรุงการนำใช้ประโยชน์จากอาหาร จากกลไกการทำงานพบว่าสามารถเพิ่มการกินอาหารได้มากขึ้นในสัตว์ ผลต่อขบวนการในกระเพาะหมัก และผลต่อระบบลำไส้ ในส่วนผลต่อกินนั้น exogenous enzyme สามารถทำให้เกิดการหลั่ง reducing sugar จากวัตถุดิบอาหาร ก่อนที่สัตว์จะได้รับอาหารนั้น โดยระดับการหลั่งน้ำตาลขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบอาหาร และชนิดของเอนไซม์ (Hristov et al., 1996) ซึ่งในการเสริมเอนไซม์ในวัตถุดิบอาหารที่มีความชื้นสูง เช่น ใน silage จะมีประสิทธิภาพมากกว่าการเสริมในวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีความชื้นต่ำเช่น เมล็ดธัญพืช และหญ้าแห้ง เป็นต้น ทั้งนี้เป็นเพราะต้องการน้ำในการ hydrolysis ของ soluble sugar ที่อยู่ในรูปโมเลกุลเชิงซ้อนให้อยู่ในรูปที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ (Beauchemin et al., 2003) จากการศึกษาการใช้เอนไซม์ Promote® (cellulase และ xylanase) เสริมใน 1) อาหารข้น (45% of TMR) 2) อาหารอัดเม็ด (4% of TMR) 3) premix (0.2% of TMR) พบว่ามีการกินได้ของสิ่งแห้ง (1.62, 1.69 และ 1.69 Kg/ kg น้ำหนักตัว ตามลำดับ) และเปอร์เซ็นต์การเคี้ยวของ DM (19.4, 18.3 และ 18.9% ตามลำดับ) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในส่วนผลต่อการหมักในกระเพาะหมัก การทำงานของ exogenous enzyme จะมีความคงทนไม่สลายตัวง่ายในกระเพาะหมัก และช่วยส่งเสริมให้เกิดการจับกันของเอนไซม์กับสารอาหาร เกิดการย่อยได้ดีขึ้น และทำให้ยืดเวลาการคงอยู่ของเอนไซม์ในกระเพาะหมักนานขึ้น (Yang et al., 1999; Morgavi et al., 2000) Chaucheryas et al. (1995) พบว่ายังมี exogenous enzyme ที่ผลิตจากเชื้อรา กลุ่ม *Aspergillus* กระตุ้นกลุ่มเชื้อราในกระเพาะหมัก ที่ช่วยปรับปรุงการย่อยของอาหารเยื่อใย และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์จากกระเพาะหมักให้มีประสิทธิภาพ ในส่วนผลต่อการทำงานของลำไส้ exogenous enzyme สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยเยื่อใยในส่วนของลำไส้เล็ก โดยจากการศึกษาของ Hristov et al. (1998, 2000) ถึงการเสริม exogenous polysaccharide degrading enzyme (EPDE) ที่ประกอบด้วย cellulase และ xylanase ในอาหาร พบว่ามีผลต่อการเพิ่มการทำงานของ xylanase ในส่วน duodenum และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในกระเพาะหมักด้วย ส่วนการใช้สารสกัดจากสมุนไพรใน

ประเทศไทยเพิ่งเริ่มมีการศึกษาใช้ในสัตว์ต่างๆเช่นในการทดลองในสุกรโดยใช้ฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง ขมิ้นชัน เปลือกมังคุด(ยุทธนาและคณะ,2544) พบว่าได้ผลดีสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ 100% พัทธวีวรรณและคณะ(2547) ทดลองใช้ ฟ้าทะลายโจร กระเทียม ขมิ้นชันในไก่ไข่พบว่าฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันช่วยให้ผลผลิตไข่ดีขึ้น Davidson and Naidu, 2000 พบว่ามีสารสกัดหลายกลุ่มที่สามารถนำมาใช้ในโคได้เช่นสารจาก Saponins ได้จาก *Yucca schidigera* หรือ *Trigonella foenum graecum*), สารกลุ่ม terpenoids (หรือสาร carvacrol, carvone, thymol, terpinen-4-ol) และสาร phenylpropanoids (สารกลุ่มเดียวกับ cinnamaldehyde, eugenol, หรือ anethol) Reuter et al.(1996) ศึกษาการใช้น้ำมันสกัดจากกระเทียม (Garlic oil, *Allium sativa*) น้ำมันนี้ประกอบด้วยสารประกอบต่างๆเป็นต้นว่า allicin ($C_6H_{10}S_2O$), diallyl sulfide ($C_6H_{10}S$), diallyl disulfide ($C_6H_{10}S_2$), allyl mercaptan (C_3H_6S) (Lawson, 1996) น้ำมันนี้ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี การใช้ที่ 300 mg/l rumen fluid ลดการสร้าง acetate และลด branched-chain VFA เพิ่มโปรตีนสายสั้น (Busquet et al., 2005) ดังนั้นการใช้สมุนไพรเสริมในสัตว์เคี้ยวเอื้องจึงมีความเป็นไปได้ ในเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และผลผลิตที่ได้จากกระบวนการย่อยอาหาร ซึ่งจะส่งผลให้ตัวสัตว์ได้รับประโยชน์จากอาหารและสามารถให้ผลผลิตได้มากขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้สมุนไพรไทยในรูปแบบแห้ง และน้ำมันสกัด
2. เพื่อหาระดับการใช้และชนิดของสมุนไพรไทยที่เหมาะสมในการช่วยย่อยอาหารโค
3. เพื่อพัฒนารูปแบบการใช้งานในเชิงอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การใช้สมุนไพรในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

กระบวนการหมักย่อยอาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้องอาศัยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักเป็นหลัก โดยการย่อยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์นั้นจะได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid; VFA) ประกอบด้วย acetate, propionate และ butyrate เป็นต้น ซึ่งผลผลิตเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นที่สามารถนำไปผลิตเป็นกรดไขมัน และกลูโคส เพื่อสัตว์จะได้นำผลผลิตเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการให้ผลผลิต แต่ในกระบวนการผลิต VFA นั้น จะมีไฮโดรเจนออกมาในกระบวนการโดยเฉพาะการผลิต acetate จะมีไฮโดรเจนออกมามาก ซึ่งไฮโดรเจนนี้จะไปรวมตัวกับคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดก๊าซมีเทน ซึ่งก๊าซมีเทนจะไม่มีผลทำให้การผลิต VFA ลดลง โดยเฉพาะ propionate (Chesworth, 1992) สอดคล้องกับ Zinn et al. (1993) ทำการศึกษาการใช้ monensin เพื่อลดการผลิตก๊าซมีเทน และเพิ่ม VFA พบว่า การใช้ monensin ในระดับ 33 mg/kg DM สามารถลดการผลิตก๊าซมีเทนและเพิ่มความเข้มข้นของ propionate ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ การเสริม biocarbonate ในการศึกษาของ Patra et al. (2005) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากพืชต่อกระบวนการผลิตก๊าซมีเทน และกระบวนการหมักของอาหารในหลอดทดลองที่ได้ของเหลวในกระเพาะ

หมักจากกระปือ พบว่าการใช้สารสกัดจาก *Terminalia chebula* ในระดับ 0.25 และ 0.5 ml สามารถลดการผลิตก๊าซมีเทน (22 และ 16 ml/g DM ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมสารสกัดจากพืช (31 ml/g DM) แต่การเสริม *Terminalia belerica*, *Emblica officinalis* และ *Azadirachta indica* ในระดับ 0.25 ml ไม่สามารถลดการผลิตก๊าซมีเทนได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมสารสกัดแต่เมื่อเสริมในระดับ 0.50 ml สามารถลดการผลิตก๊าซมีเทนได้

Pen et al. (2006) ได้ทำการศึกษาศาสตร์จาก *Yucca schidiger* และ *Quillaja saponaria* ที่มีผลต่อกระบวนการหมักและการผลิตก๊าซมีเทน พบว่าการเสริม *Y. schidiger* ที่ระดับ 2, 4 และ 6 ml/l ทำให้ลดการผลิตก๊าซมีเทน (0.24, 0.20, 0.17, 0.14 ml/min ตามลำดับ) และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ propionate แต่ไม่สามารถเพิ่มสัดส่วนของอะซิเตตกับโพรไพโอเนต

Devant et al. (2006) ได้ศึกษาการเสริมสารสกัดจากพืช cynarin, ginseng และ fenugreek เปรียบเทียบกับการเสริม monensin ในโคเพศผู้พันธุ์โฮลสไตน์ พบว่า การเสริมสารสกัดจากพืช (ผสมรวมกัน artichoke: 200-300 g/kg ; Siberian ginseng: 150-250 g/kg ; fenugreek: 550-650 g/kg) เสริมที่ระดับ 2.8 g/kg concentrate DM มีผลทำให้เพิ่มกรดไขมันระเหยได้ทั้งหมด (102.2 mM), ความเข้มข้นของ propionate (52.4 mol/100 mol) และสัดส่วนของอะซิเตตกับโพรไพโอเนต (0.84mol/100 mol) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมสารสกัดจากพืช และกลุ่มเสริม monensin สอดคล้องกับ

Busquet et al. (2005) ได้ศึกษาการเสริมน้ำมันกระเทียมในหลอดทดลองในระดับ 312 mg/L of culture fluid สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ propionate (32.0 mol/100 mol) แต่ไม่สามารถเพิ่มกรดไขมันระเหยได้ทั้งหมด และสัดส่วนของอะซิเตตกับโพรไพโอเนต เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับ Cardozo et al. (2004) ได้ทำการศึกษาศาสตร์จากพืชธรรมชาติต่อการเพิ่มความเข้มข้นของ VFA พบว่าการเสริม pepper 7.5 mg/kg DM สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ propionate (25.7 mol/100 mol) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมสารสกัดจากพืช (23.8mol/100 mol) และการเสริม cinnamon, garlic, yucca และ oregano สามารถเพิ่มสัดส่วนของอะซิเตตกับโพรไพโอเนต แต่ cinnamon ไม่สามารถเพิ่มกรดไขมันระเหยได้ทั้งหมด (ตาราง 1) Bodas et al.(2008) ได้ศึกษาในพืช 450 ตัวอย่างพบว่า พืชที่มีสาร tannin และ saponin จะลดการสร้างมีเทน และยับยั้งการเจริญของ Methanogenic bacteria ส่วน saponin นอกจากลดมีเทนยังด้านการทำงานของโปรโตซัวด้วย ส่วน flavonoid ออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและลบ ซึ่งพบว่าพืชในตระกูล *Rheum nobile* และ *Carduus pycnocephalus* สามารถลดการผลิตมีเทนและเพิ่มการย่อยได้ Alexander et al. (2008) ได้ศึกษาในการสกัดด้วยน้ำใน *Picrorhiza kurroa* root และการสกัดด้วย methanol ในเมล็ด *Moringa oleifera* พบว่าทั้งสองวิธีสามารถสกัดสารได้ดีและสารที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมกระตุ้นการใช้พลังงานและโปรตีนในโคเนื้อได้ดี Castillejos et al.(2008) ได้ศึกษาพบว่าเมื่อใช้น้ำมันสกัดจาก clove leave, hyssop, sage tea tree ,rosemary จะทำให้น้ำที่คล้าย monensin เพิ่ม propionate ลด acetate butyrate และ lavender, oregano จะลดการผลิต VFA ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อโค ส่วน thyme, , savory จะใช้ได้ดีเพราะเพิ่ม VFA ลดแอมโมเนีย จึงใช้ได้ในการผลิตโค จะเห็นได้ว่าการใช้สมุนไพรชนิดต่าง ๆ

สามารถลดการผลิตก๊าซมีเทนในกระบวนการหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ ซึ่งการลดก๊าซมีเทนนี้สามารถทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการกินและการย่อยอาหารได้และยังมีการผลิตกรดไขมันระเหยได้มากขึ้น

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดจากพืชต่อการความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้

	Total VFA	Individual VFA (mol/100mol)				References
	(mM)	Acetate(A)	Propionate(P)	Butyrate	A:P	
cinnamon ^{1/}	102.3	58.1	22.3	12.7	2.8	Cardozo et al. (2004)
garlic ^{1/}	114. 5	58.3	21.6	12.4	2.9	
yucca ^{1/}	109.9	59.6	21.3	12.3	2.9	
oregano ^{1/}	108.7	58.7	20.3	13.8	3.0	
pepper ^{1/}	112.7	55.9	25.7	12.5	2.2	
garlic ^{2/}	100.9	46.1	32.0	15.6	1.4	Busquet et al. (2005)
PE ^{3/}	102.2	41.5	52.4	4.1	0.84	Devant et al. (2006)
Monensin ^{3/}	93.2	42.9	51.1	4.1	0.82	

¹เสริมสารสกัดในระดับ 7.5 mg/kg DM

²เสริมสารสกัดในระดับ 312 mg/L of culture fluid

³Plants extract; PE = สารสกัดผสม artichoke: 200-300 g/kg ; Siberian ginsen: 150-250 g/kg ; fenugreek: 550-650 g/kg เสริมที่ระดับ2.8 g/kg concentrate DM

³monensin เสริมในระดับ 32 mg/kg concentrate DM

การผลิต ammonia N และ pH

ไนโตรเจนในกระเพาะหมักสามารถเปลี่ยนไปเป็น ammonia ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญของการเริ่มกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์สามารถทำให้เป็น amino acid ที่ได้จากแหล่งของไนโตรเจน การเสริมสารประกอบไนโตรเจน, โปรตีน และ non-protein ระดับต่ำในสูตรอาหาร จุลินทรีย์จะไม่สามารถใช้ประโยชน์จาก ammonia ได้ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Chesworth, 1992) ดังนั้น

Busquet et al. (2006) ทำการศึกษาสารสกัดจากพืชต่อกระบวนการหมักในกระเพาะหมัก พบว่า carvacrol, clove bud oil, eugenol, oregano oil, anethol, dillweed oil และ ginger oil ในระดับ 3,000 mg/L สามารถเพิ่มค่า pH เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริม ผลต่อการผลิต NH₃-N เสริม Anethol, Dillweed oil และ Ginger oil ที่ระดับ 300 mg/L สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ NH₃-N แต่เสริม carvacrol, clove bud oil และ eugenol ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ NH₃-N เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับ Busquet et al. (2005) ศึกษาผลของ garlic oil ต่อกระบวนการหมักในกระเพาะหมัก พบว่า การเสริม garlic oil, Diallyl sulfide, Diallyl disulfide และ Allyl mercaptan สามารถเพิ่มค่า pH (6.6) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ที่ไม่ได้เสริม (6.2) การผลิต $\text{NH}_3\text{-N}$ พบว่า การเสริมที่ระดับ 3, 30, 300 mg/L สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ $\text{NH}_3\text{-N}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่1 การหาสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ช่วยย่อยอาหาร

อุปกรณ์วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในรูปแบบแห้ง

งานทดลองได้ใช้พืชสมุนไพรไทยที่มีคุณสมบัติโดยรวมในการช่วยย่อยอาหารและลดการเกิดก๊าซในกระเพาะอาหาร เป็นกลุ่มที่ใช้บริโภคอุปโภคทั่วไปและเป็นพืชที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น ได้แก่ กระเทียม ขมิ้นดำ ขมิ้นอ้อย หวานหอมแดง หวานเสน่ห์จันทร์หอม ใบสะเดา เม็ดสะเดา ตะไคร้บ้าน โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารสมุนไพรดังนี้

1. นำพืชสมุนไพรมาคัดแยกความสะอาดและความบริสุทธิ์
2. นำพืชที่ได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 C เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง เพื่อเก็บรสดำเนินขั้นตอนต่อไป
3. นำพืชสมุนไพรแห้งที่เตรียมไว้แล้วมาบดละเอียดเพื่อเตรียมรสดำเนินนำไปผสมกับสูตรอาหารเพื่อทดลองต่อไป

การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในรูปแบบน้ำมันสกัด

งานทดลองได้ใช้น้ำมันที่สกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่มีคุณสมบัติโดยรวมในการช่วยย่อยอาหารและลดการเกิดก๊าซในกระเพาะอาหาร โดยเลือกใช้พืชที่สามารถนำมาสกัดให้สารสกัดจากน้ำมันได้มากที่สุดเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น ได้แก่ น้ำมันขิง น้ำมันตะไคร้บ้าน น้ำมันมะนาว น้ำมันมะกูด น้ำมันสน น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันมินต์

(1) การเตรียมพืชที่เป็นวัตถุดิบ

- การตรวจชนิดของพืชและ ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม

การสกัดสารสำคัญของพืชนั้น ใช้พืชสด นำมาสกัดโดยตรงหรืออาจทำให้สมุนไพรแห้งเสียก่อนเพื่อความสะดวกและช่วยลดปริมาณของตัวทำละลายที่ต้องใช้ในการสกัดขั้นตอนนี้อาจทำได้โดยการทิ้งให้พืชแห้งในอากาศ หรือให้ความร้อนจากพลังงานอื่นๆ เช่น ตู้อบไฟฟ้าได้ จากนั้นจึงทำการบดเนื้อเยื่อ เพื่อให้การสกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจอาศัยการบดในกรณีที่พืชแห้ง หรือหั่นถ้าเป็นพืชสดได้ โดยทั่วไปแล้วการสกัดจะได้ผลดี ถ้าสกัดสารจากพืชสด โดยการนำเอาพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเอนไซม์เสียก่อน เป็นการป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงแต่หากไม่สะดวกก็ต้องนำพืชสดที่เป็นวัตถุดิบมาทำให้แห้งเสียก่อน และในการศึกษานี้ได้จากการนำพืชสมุนไพรมาทำให้แห้งก่อนแล้วจึงนำมาสกัดสารสำคัญต่อไป

(2) การสกัด (Extraction)

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ เช่น Maceration เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด, Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ, Liquid – liquid Extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธี Soxhlet Extractor ดังนี้

การสกัดด้วย Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวละลายใน Flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้

(3) การทำ สารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อได้สารสกัดขั้นต้นแล้ว สารที่ได้จากพืชมีปริมาณมากและเจือจาง ต้องนำไปแยกทำ ให้เข้มข้นก่อน ซึ่งทำได้โดยใช้ Free evaporation คือการระเหยแห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate เมื่อได้สารสกัดเข้มข้นแล้วจะได้นำไปแช่ตู้เย็นเก็บไว้เพื่อร่อนนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ซึ่งอยู่ในขั้นตอนการเตรียมทดลองอีกขั้นหนึ่ง

แผนการทดลอง

แผนการทดลองที่ใช้ทั้งงานทดลองแบบใช้สารสมุนไพรแห้ง กับงานทดลองการใช้สมุนไพรแบบน้ำมันสารสกัด คือใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับการใช้สารสมุนไพรในรูปแห้งและน้ำมันสกัดเช่นกันคือ มี 3 ระดับที่ 0.1, 1.0 และ 10 กรัม/กิโลกรัมอาหารตามลำดับ โดยองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองคำนวณโดยใช้โปรแกรม KCF 2006 (วิโรจน์และมนต์ชัย, 2549) อาหารทุกสูตรมีระดับโปรตีน พลังงานเท่ากันคือ 12.6% และ TDN 68% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารทดลองและโภชนะจากการคำนวณ(%DM)

รายการวัตถุดิบ	นน.แห้ง (%)
กากถั่วเหลือง	25.0
มันสำปะหลัง	24.0
ฟางข้าว	50.0
วิตามินแร่ธาตุ	1.0
รวม	100.0
คุณค่าทางโภชนะ	%
DM	89.6
TDN	68.0
CP	12.6
ADF	23.0
NDF	38.0
Ash	11.8



การเตรียม rumen inoculum ตัวอย่างอาหาร และ Batch culture

ศึกษาการย่อยได้ของวัตถุดิบและเชื้อในสูตรอาหาร (*in vitro* digestibility) โดยใช้เครื่อง Daisy II Incubator (Ankom Technology, Fairport, NY) มีวิธีการดังนี้

1. ใช้โคนมระยะแห้งนมโฮลสโตน์ฟรีเชียน จำนวน 1 ตัวเพื่อใช้เป็นแหล่งเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ที่เลี้ยงด้วยอาหารหยาบ (หญ้าสดและฟางข้าว) ให้กินเต็มที่ และเสริมอาหารข้นวันละ 4 กิโลกรัม แบ่งเป็นมือเช้า 2 กิโลกรัม และมือเย็น 2 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการเก็บ rumen fluid ช่วงเช้าก่อนให้อาหารเพื่อใช้ในการเตรียมสารละลาย (rumen inoculum) โดยใช้ท่อดูดของเหลวสอดผ่านทางปากไปยังกระเพาะรูเมน (stomach tube technique)

2. เตรียม F 57 filter bag ตามจำนวนตัวอย่างอาหารที่จะใช้หาค่าการย่อยได้ นำไปล้างด้วย acetone 3 – 5 นาที และทิ้งให้แห้งโดยไม่ต้องอบ ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_1)

3. นำตัวอย่างอาหารทดลอง บดผ่านตะแกรงร่อนขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 3 กรัม/ซ้ำ ใส่ลงใน filter bag บันทึกน้ำหนัก (W_2) ปิดผนึกปากถุงด้วยลวดความร้อน ส่วนตัวอย่างอาหารทดลองที่เหลือนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ DM, CP, Fat และ Ash (AOAC, 1985) รวมถึง ADF และ NDF (Ankom Technology, Fairport, NY)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ห้องสมุดงานวิจัย

วันที่... 22 ส.ย. 2555

เลขทะเบียน... 246170

เลขเรียกหนังสือ.....

4. นำ F 57 filter bag (ถุงเปล่า) ชั่งน้ำหนักและปิดผนึกเช่นเดียวกับถุงที่ใส่ตัวอย่างอาหารเพื่อใช้เป็น correction factor (C_1)

5. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution) ที่ใช้สำหรับบ่มตัวอย่างอาหาร โดยเตรียมจาก Solution A (ใช้ KH_2PO_4 10 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, NaCl 0.5 กรัม, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัม, และ urea 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับให้ได้ 1 ลิตร) และ Solution B (ใช้ Na_2CO_3 15 กรัม และ $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับให้ได้ 1 ลิตร)

6. นำสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 1,600 มิลลิลิตร (Solution A จำนวน 1,330 มิลลิลิตร และ B จำนวน 266 มิลลิลิตร) ผสมลงใน digestion jar แล้วนำไปใส่ใน Daisy II Incubator ปรับอุณหภูมิของ digestion jar ให้คงที่ ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 – 30 นาที

7. เติม rumen inoculum ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน 400 มิลลิลิตร/ digestion jar พร้อมทั้งใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3 แล้วไล่อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 30 วินาทีและปิดฝาให้แน่น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 39 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง -

8. หลังจากการบ่มนำ F 57 filter bag มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำเย็นจนกระทั่งน้ำล้างใส อบให้แห้งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) เพื่อใช้คำนวณหาค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง

9. นำ F 57 filter bag ที่อบแห้งแล้วในข้อ 8 ไปวิเคราะห์ปริมาณ NDF, ADF (Ankom Technology, Fairport, NY) เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยได้ของ NDF และ ADF (Cherney et al., 2004)

การคำนวณหาค่าการย่อยได้

- การย่อยได้ของวัตถุดิบ (*in vitro* as fed digestibility, IVAFD) คำนวณจากสมการ

$$\text{IVAFD} (\%) = 100 - ((W_3 - (W_1 \times C_1)) \times 100 \div W_2)$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุงเปล่า

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารสุทธิ (น้ำหนักสด)

W_3 = น้ำหนักถุงสุดท้ายหลังจากการบ่ม 48 ชั่วโมงและอบแห้ง

C_1 = Blank bag correction (น้ำหนักถุงเปล่าหลังจากการบ่ม 48 ชั่วโมงและอบแห้ง $\div$ น้ำหนักถุงเปล่าเริ่มต้น)

- การย่อยได้ของ NDF (*in vitro* NDF digestibility, IVNDFD) คำนวณจากสมการ

$$\text{IVNDFD} (\%) = 100 - (\text{NDF ที่เหลือหลังจากการบ่ม 48 ชั่วโมง} \div \text{NDF ก่อนการบ่ม}) \times 100$$

- การย่อยได้ของ ADF (*in vitro* ADF digestibility, IVADFD) คำนวณจากสมการ

$$\text{IVADFD} (\%) = 100 - (\text{ADF ที่เหลือหลังจากการบ่ม 48 ชั่วโมง} \div \text{ADF ก่อนการบ่ม}) \times 100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยใช้ Proc. GLM และวิเคราะห์การตอบสนองของค่าสังเกตเนื่องจากอิทธิพลของระดับสมุนไพรด้วย Duncan's Multiple Range Test (SAS, 1988)

ผลการทดลองที่ 1

ผลการใช้สมุนไพรแห้งต่อการย่อยได้ของวัตถุดิบอาหารสัตว์

การใช้พืชสมุนไพรแห้งบดผสมลงในอาหารสูตรรวมที่มีฟางข้าวเป็นอาหารหยาบพบว่ามีการย่อยของวัตถุดิบของอาหารสัตว์ที่ 48 ชม (*in vitro*) ไม่มีความแตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นการผสมที่เลือกใช้ในครั้งนี้ เมื่อเทียบกับอาหารกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใช้สารสมุนไพร (ตารางที่ 3) ที่ระดับการใช้ 0.1 กรัม สมุนไพร/กก.อาหาร พบว่าสารสมุนไพรที่มีลำดับช่วยในการย่อยได้จากลำดับสูงสุดสู่ต่ำสุดคือขมิ้น อ้อย ใบสะเดา ตะไคร้ เม็ดสะเดา เสน่ห์จันทร์หอม ขมิ้นดำ หวานหอมแดง และกระเทียมตามลำดับ ส่วนที่ระดับ 1.0 กรัม สมุนไพร/กก.อาหาร พบว่าพืชสมุนไพรที่มีลำดับช่วยในการย่อยได้จากลำดับสูงสุดสู่ต่ำสุดคือขมิ้น อ้อย เม็ดสะเดา เสน่ห์จันทร์หอม ขมิ้นดำ ใบสะเดา หวานหอมแดง ตะไคร้ และกระเทียมตามลำดับ ส่วนที่ระดับ 10.0 กรัม สมุนไพร/กก.อาหาร พบว่าพืชสมุนไพรที่มีลำดับช่วยในการย่อยได้จากลำดับสูงสุดสู่ต่ำสุดคือขมิ้น อ้อย ตะไคร้ ใบสะเดา เม็ดสะเดา ขมิ้นดำ กระเทียม หวานหอมแดง และเสน่ห์จันทร์หอมตามลำดับ

ตารางที่3 ผลของสมุนไพรแห้งต่อการย่อยได้ของอาหารที่ 48 ชั่วโมง (IVDMD¹, %)

รายการ	กลุ่ม	เสน่ห์						Neem		SEM	P<
		หวาน	จันทร์		ขมิ้น	เม็ด	ใบ				
	ควบคุม	หอมแดง	หอม	กระเทียม	ขมิ้นดำ	ตะไคร้	อ้อย	สะเดา	สะเดา		
ระดับ 0.1	50.5	50.9	50.5	46	45.1	52.9	46.4	46.6	54.5	3.2	0.44
ระดับ 1.0	50.5	46.2	48.9	46	48.6	45.5	55.6	50.7	48.1	4.13	0.77
ระดับ 10.0	50.5	46.2	45.7	50.4	51	54.8	56	52.9	54.1	3.2	0.36
เฉลี่ย	50.5	47.8	48.4	47.5	48.2	51.1	52.7	50.1	52.2		

¹In vitro dry matter digestibility

ตารางที่ 4 ผลของสมุนไพรแห้งต่อการย่อยได้ของอาหารที่ 48 ชั่วโมง (IVDMD¹, %)

รายการ	ระดับ			SEM	P<
	ระดับ 0.1	ระดับ 1.0	10.0		
กลุ่มควบคุม	50.5	50.5	50.5	0.5	1
หวานหอมแดง	50.9	46.2	46.2	2.39	0.39
เสน่ห์จันทร์หอม	50.5	48.9	45.7	2.31	0.42
กระเทียม	46	46	50.4	4.06	0.7
ขมิ้นดำ	45.1	48.6	51	3.67	0.58
ตะไคร้	52.9 ^{ab}	45.5 ^b	54.8 ^a	1.77	0.06
ขมิ้นอ้อย	46.4 ^b	55.6 ^{ab}	56 ^a	2.09	0.07
เม็ดสะเดา	46.6	50.7	52.9	5.49	0.73
ใบสะเดา	54.5	48.1	54.1	5.81	0.71

¹ *In vitro* dry matter digestibility

^{ab} Means within a row without a common superscript letter differ (P<0.05)

เมื่อพิจารณาผลของระดับการใช้ในแต่ละสมุนไพรจะพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นการใช้เพิ่มขึ้นสมุนไพรชนิดที่จะช่วยเพิ่มการย่อยได้ของวัตถุแห้งเพิ่มขึ้นในทิศทางการตอบสนองแบบเส้นตรงคือ กระเทียม ขมิ้นดำ ตะไคร้ ขมิ้นอ้อย เม็ดสะเดา ส่วนหวานหอมแดงและเสน่ห์จันทร์หอมจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร แต่อย่างไรก็ตามในสมุนไพรตะไคร้และขมิ้นอ้อยเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นจะตอบสนองต่อระดับการใช้ที่ดีขึ้นในแนวเส้นตรงอันแสดงให้เห็นว่ามีโอกาสที่จะใช้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นหากหวังผลเพิ่มการย่อยได้อาหารมากขึ้นอีก ส่วนกลุ่มที่มีการตอบสนองคงที่แม้จะเพิ่มความเข้มข้นคือ ใบสะเดา ซึ่งแสดงว่าระดับสุดที่ใช้จะเหมาะสมในการนำมาผสมอาหารได้ สำหรับสมุนไพรตะไคร้จะมีการตอบสนองแบบกราฟหงายซึ่งแสดงว่าอาจเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นของสารที่มีในสมุนไพรซึ่งอาจแปรปรวนได้เพราะนำมาใช้ในลักษณะวัตถุดิบที่ไม่ได้ผ่านการคัดแยกสารบริสุทธิ์ ส่วนขมิ้นอ้อยจะมีการตอบสนองเป็นเส้นตรงที่แตกต่างกันชัดเจน ซึ่งควรศึกษาเพิ่มปริมาณการใช้ขึ้นอีกอันอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารได้ดีมากขึ้น

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเลือกใช้สมุนไพรที่กลุ่มที่ให้ค่าการตอบสนองสูงกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมจะมีสมุนไพรที่ได้รับคัดเลือกคือ ตะไคร้ ขมิ้นอ้อย เม็ดสะเดา ใบสะเดา



ตารางที่5 ผลของน้ำมันสมุนไพรต่อการย่อยได้ของอาหารที่ 48 ชั่วโมง (IVDMD¹, %)

ระดับใช้, กรัม/กก. อาหาร	กลุ่ม ควบคุม	น้ำมัน						น้ำมัน		SEM	P<
		น้ำมัน โรสแมรี่	ตะไคร้ บ้าน	น้ำมัน จิง	น้ำมัน มะนาว	น้ำมัน มะกอก	น้ำมัน มันต์	ยูคา ลิปดัส	น้ำมัน สน		
ระดับ 0.1	51ab	46.2bcd	42.5cd	38.7d	41.2d	43.7cd	47.5bc	47.5bc	55a	1.70	0.00%
ระดับ 1.0	51bc	35f	38.7ef	50bc	43.7de	43.7de	46.2cd	53.7ab	58.7a	1.80	0.001
ระดับ 10.0	51ab	41.2d	45cd	41.2d	45cd	45cd	48.7bc	47.5bc	55a	1.42	0.001%
เฉลี่ย	51.0	40.8	42.1	43.3	43.3	44.1	47.5	49.6	56.2		

¹In vitro dry matter digestibility

^{abcdf} Means within a row without a common superscript letter differ (P<0.05)

ผลการใช้น้ำมันสมุนไพรต่อการย่อยได้ของวัตถุดิบ

การใช้น้ำมันสมุนไพรผสมลงในสูตรอาหารรวมที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำมันสกัดจากสมุนไพร 8 ชนิด พบว่ามีค่าการย่อยได้วัตถุดิบของอาหารที่48 ชม (*in vitro*) แตกต่างในทุกระดับการเลือกใช้ของความเข้มข้น ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 กรัม/น้ำมันสกัด/กก.อาหาร มีสมุนไพรที่ช่วยการย่อยได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมเพียงชนิดเดียวคือ น้ำมันสน แต่สมุนไพรที่ให้ค่าการย่อยได้วัตถุดิบไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมคือ โรสแมรี่ มันต์ และยูคาลิปดัส นอกนั้นให้ค่าการย่อยได้ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และที่ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัม/น้ำมันสกัด/กก.อาหาร มีสมุนไพรที่ช่วยการย่อยได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมชัดเจนถึงสองชนิดคือ น้ำมันยูคาลิปดัส และน้ำมันสน และสมุนไพรที่ให้ค่าการย่อยได้วัตถุดิบไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมคือ น้ำมันจิง น้ำมันมัน และน้ำมันยูคาลิปดัส นอกนั้นให้ค่าการย่อยได้ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10.0 กรัม/น้ำมันสกัด/กก.อาหาร มีสมุนไพรที่ช่วยการย่อยได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมคือ น้ำมันสน และสมุนไพรที่ให้ค่าการย่อยได้วัตถุดิบไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมคือ น้ำมันมันกับยูคาลิปดัส ดังนั้นหากพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของสมุนไพรที่ให้การตอบสนองช่วยอาหารได้ดีกว่าหรือเท่ากับกลุ่มควบคุมจึงมีสมุนไพรที่นำมาใช้ได้เพียงสามชนิดคือ น้ำมันสน น้ำมันยูคาลิปดัส และน้ำมันมันต์

การใช้น้ำมันที่ได้จากสารสกัดผสมลงในอาหารสัตว์พบว่าการตอบสนองค่อนข้างต่ำซึ่งอาจจะเกี่ยวเนื่องจากระดับความเข้มข้นของสมุนไพร ซึ่งหากมีความเข้มข้นมากเกินไปอาจมีผลกระทบทางอ้อมต่อการรบกวนการย่อยได้ของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจเกิดเนื่องจากผลของน้ำมันโดยตรงที่ไปรบกวนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นในน้ำมันสกัดบางชนิดที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ต่อไป จึงควรมีการศึกษาในรายละเอียดถึงผลกระทบอื่นๆเพิ่มเติม

ตารางที่6 ผลของน้ำมันสมุนไพรแห้งต่อการย่อยได้ของอาหารที่ 48 ชั่วโมง (IVDMD¹, %)

รายการ	ระดับ			SEM	P<
	ระดับ 0.1	ระดับ 1.0	10.0		
กลุ่มควบคุม	51	51	51	1	1
น้ำมันโรสแมรี่	46.2a	35b	41.2ab	1.767767	0.0461
น้ำมันตะไคร้บ้าน	42.5	38.7	45	1.6137431	0.1506
น้ำมันจิง	38.7 ^b	50 ^a	41.2 ^b	1.0206207	0.0089
น้ำมันมะนาว	41.2	43.7	45	1.0206207	0.1643
น้ำมันมะกูด	43.7	43.7	45	1.767767	0.8538
น้ำมันมินต์	47.5	46.2	48.7	1.767767	0.8538
น้ำมันยูคาลิปตัส	47.5	53.7	47.5	2.6020825	0.2901
น้ำมันสน	55	58.7	55	1.6137431	0.3065

¹In vitro dry matter digestibility

^{ab}Means within a row without a common superscript letter differ (P<0.05)

เมื่อพิจารณาการช่วยการย่อยได้ในแนวการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงที่สอดคล้องกับการเพิ่มระดับการใช้จากระดับ0.1 g/kg เป็นระดับ 10.0 g/kg ในสมุนไพรชนิดต่างๆพบว่าสมุนไพรที่ตอบสนองในเชิงเส้นตรงเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นคือ น้ำมันตะไคร้บ้าน น้ำมันมะนาว น้ำมันมะกูด น้ำมันมินต์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระดับความเข้มข้นและทำให้เห็นว่าแม้การตอบสนองเพิ่มการย่อยได้อาหารยังสูงสู่กลุ่มควบคุมไม่ได้เนื่องจากระดับที่ใช้ยังต่ำกว่า ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มและเพิ่มระดับการใช้มากขึ้น อาจทำให้การตอบสนองดีขึ้นกว่าที่เป็นอยู่ได้ ส่วนน้ำมันยูคาลิปตัสและน้ำมันสนจะให้ค่าการตอบสนองค่อนข้างคงที่ในระดับสูงที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและแม้การตอบสนองจะไม่ต่างกันแต่จากตัวเลขตอบสนองทำให้เห็นว่าควรใช้น้ำมันสนและยูคาลิปตัสในระดับ 1.0 กรัม/กก.อาหาร จะเหมาะสมที่สุด ส่วนน้ำมันที่ยังเพิ่มระดับความเข้มข้นแล้วการตอบสนองลดลงคือ น้ำมันโรสแมรี่อย่างเดียว

อย่างไรก็ตามเห็นได้ว่าการนำใช้สารสมุนไพรในรูปแบบน้ำมันเติมในอาหารสัตว์สัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีส่วนช่วยในการย่อยได้ไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของการเป็นน้ำมัน ที่อาจมีกลไกทำงานในลักษณะยับยั้งซึ่งกันและกันกับตัวจุลินทรีย์ เพราะสารในรูปแบบน้ำมันอาจรบกวนการเข้าไปย่อยอาหารและการเคลื่อนอาหาร ทำให้แทนที่จะเป็นผลดีกลับทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตช้าและเข้าช่วยย่อยอาหารได้ต่ำ