

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของการเสริมสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรปริมาณ 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกรหลังหย่านม มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาน้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กิน อัตราการแลกเนื้อ อัตราการเลี้ยงรอด ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย อี.โคไล และซัลโมเนลลา ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และอัตราส่วนของนิวโทรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (neutrophil: lymphocyte ratio; H:L ratio) ซึ่งมีวิธีดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 4 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยทรีตเมนต์ที่ทดลองประกอบด้วย

ทรีตเมนต์ที่ 1 : อาหารไม่เสริมสารปฏิชีวนะและสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจร
(อาหารควบคุม)

ทรีตเมนต์ที่ 2 : อาหารเสริมสารปฏิชีวนะ Colistin ปริมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (100 ppm)

ทรีตเมนต์ที่ 3 : อาหารเสริมสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรปริมาณ 0.25 เปอร์เซ็นต์

ทรีตเมนต์ที่ 4 : อาหารเสริมสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรปริมาณ 0.50 เปอร์เซ็นต์

2. สุกกรทดลอง

สุกกรทดลองเป็นลูกสุกรหย่านม 3 สายเลือด (ลาจไวท์+แลนด์เรซ+ดอร์คเจอร์ซี่) ที่อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 48 ตัว เป็นลูกสุกรจากบริษัท เบทาโกรภาคใต้ จำกัดทั้งหมด สุ่มลูกสุกรลงคอกทดลอง คอกละ 4 ตัว ประกอบด้วยสุกรเพศผู้จำนวน 2 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว จำนวน 12 คอก ทำการทดลองจนสุกรมีอายุ 10 สัปดาห์ ซึ่งมีระยะเวลาในการทดลองเป็นเวลา 7 สัปดาห์

3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1 ฟัทะลายโจรทั้งต้น (ยกเว้นราก) อบแห้ง

3.2 สารปฏิชีวนะ Colistin ทางการค้า (Colitech®) ที่มี Colistin 12,000,000,000 IU

3.3 อาหารทดลอง ที่มีระดับโภชนาตามความต้องการของสุกรหย่านม โดยมีส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ ปลายข้าว ข้าวโพด รำละเอียด กากถั่วเหลือง ปลาป่น หางนมผง ไคแคลเซียม เกลือ น้ำมันปาล์ม และฟอสฟอรัส

3.4 สุกรทดลอง เป็นลูกสุกรหย่านม 3 สายเลือด (ลาจไวท์+แลนด์เรซ+ดรูคเจอร์ซี่) จากบริษัท เบทาโกรภาคใต้ ที่มีอายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 48 ตัว เป็นเพศผู้ 24 ตัว และเพศเมีย 24 ตัว

3.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สกัดหยาบฟัทะลายโจร ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์ ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 3 ลิตร และ 5 ลิตร กระดาษกรอง No.1 กระบอกตวง (Cylinder) ถาดหลุม เครื่องซังสารเคมี เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporation) และตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot air Oven)

3.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผสมอาหาร ได้แก่ เครื่องซัง เครื่องบดอาหารแบบค้อนเหวี่ยง (Hammer mill) เครื่องบดละเอียด เครื่องผสมอาหารชนิดแนวนอน และกระสอบใส่อาหาร

3.7 โรงเรือนและอุปกรณ์เลี้ยงสุกร ได้แก่ โรงเรือนระบบเปิด รางอาหาร จับน้ำ ห้องเก็บอาหาร และเครื่องซัง

3.8 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงมือยาง Transport medium และ Cotton bud กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยาเบอร์ 21 x 1½ นิ้ว หลอดเก็บเลือดที่มีสาร anticoagulant และกระดิกแช่เย็นที่มีฝาปิดมิดชิด

4. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ประกอบด้วย ขั้นตอนเตรียมการทดลอง และขั้นตอนทดลอง

4.1 ขั้นตอนเตรียมการทดลอง ได้แก่ เตรียมโรงเรือนเลี้ยงสุกร เตรียมสารสกัดหยาบฟัทะลายโจร และเตรียมอาหารทดลอง

4.1.1 เตรียมโรงเรือนเลี้ยงสุกร จัดเตรียมโรงเรือนเพื่อใช้เลี้ยงสุกร ซึ่งเป็นโรงเรือนระบบเปิดพื้นซีเมนต์ กันแยกคอกด้วยอิฐบล็อกจำนวน 12 คอก ติดตั้งรางอาหารและจับน้ำคอกละ 1 ชุด ล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคแต่ละคอกก่อนนำสุกรเข้าเลี้ยง ติดตั้งหลอดไฟที่ให้แสงสว่างอย่างเพียงพอ

4.1.2 เตรียมสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร (ดัดแปลงจากประกาศนียบัตร และคณะ 2552; 238-239) มีขั้นตอนการเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ดังนี้

1) นำฟ้าทะลายโจรสดทั้งต้นยกเว้นราก มาอบแห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน หลังจากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดละเอียด ซึ่งจะได้ฟ้าทะลายโจรที่มีลักษณะเป็นผงละเอียด

2) หักผงฟ้าทะลายโจรในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ในสัดส่วนของ ฟ้าทะลายโจรผง 100 กรัมต่อแอลกอฮอล์ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่งผงฟ้าทะลายโจร 1,000 กรัม หมักในแอลกอฮอล์ 10 ลิตร ใช้เวลาหมักนาน 5 วัน

3) นำแอลกอฮอล์ที่หมักฟ้าทะลายโจรมากรองเอาเฉพาะส่วนใสด้วย กระดาษกรอง No.1 แล้วนำส่วนของเหลวกรองได้ไปสกัดโดยการระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ภายใต้ สุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้ ของเหลวที่เป็นสารสกัดที่มีสีเขียวเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 3.1

4) นำสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีสีเขียวเข้มผสมแป้งข้าวเจ้า 250 กรัม จะได้ สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีลักษณะเป็นผงสีเขียวอ่อน ดังแสดงในภาพที่ 3.2 จากนั้นจึงนำไปอบด้วย ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 55 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงก่อนนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 สารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรในรูปของเหลว



ภาพที่ 3.2 สารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรในรูปผงละเอียด

4.1.3 เตรียมอาหารทดลอง โดยเตรียมอาหารทดลองตามแผนการทดลองที่มี 4 ทริตเมนต์ ดังนี้

1) ผสมอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกสุกรหย่านม ที่มีระดับสารอาหารต่างๆ ตามความต้องการโภชนะของสุกรหย่านมที่แนะนำโดย NRC (1998) โดยส่วนประกอบของอาหารทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 และมีสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีโดยการคำนวณแสดงในตารางที่ 3.2

2) เสริมสารปฏิชีวนะ Colistin และสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจร ตามแผนการทดลอง ดังนี้

ทริตเมนต์ที่ 1 : อาหารไม่เสริมสารปฏิชีวนะและสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจร (อาหารควบคุม)

ทริตเมนต์ที่ 2 : อาหารเสริมสารปฏิชีวนะ Colistin ปริมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารปฏิชีวนะ Colistin จำนวน 10 กรัมต่อปริมาณอาหารผสม 100 กิโลกรัม

ทริตเมนต์ที่ 3 : อาหารเสริมสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรปริมาณ 0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจร 250 กรัมต่อปริมาณอาหารผสม 100 กิโลกรัม

ทริตเมนต์ที่ 4 : อาหารเสริมสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรปริมาณ 0.50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจร 500 กรัมต่อปริมาณอาหารผสม 100 กิโลกรัม

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารทดลองและองค์ประกอบทางโภชนาของกลุ่มควบคุม

ส่วนประกอบอาหาร	ทรีตเมนต์ 1 (ก.ก.)	ทรีตเมนต์ 2 (ก.ก.)	ทรีตเมนต์ 3 (ก.ก.)	ทรีตเมนต์ 4 (ก.ก.)
ปลายข้าว	22.5	22.5	22.5	22.5
ข้าวโพด	30	30	30	30
รำละเอียด	10	10	10	10
กากถั่วเหลือง (44%)	24.5	24.5	24.5	24.5
ปลาป่น (55%)	6.25	6.25	6.25	6.25
หางนมผง	5	5	5	5
ไคแคลเซียม	0.53	0.53	0.53	0.53
เกลือ	0.02	0.02	0.02	0.02
น้ำมันปาล์ม	1	1	1	1
พรีมิกซ์	0.2	0.2	0.2	0.2
Colistin	-	0.01		
สารสกัดฟ้าทะลายโจร	-	-	0.25	0.50
ส่วนประกอบทางเคมีโดยการคำนวณ	สัดส่วนที่คำนวณได้			
โปรตีน (%)	20.92			
พลังงาน (kcal/kg)	3,238.1			
เยื่อใย (%)	4.63			
ไขมัน (%)	3.25			
แคลเซียม (%)	0.66			
ฟอสฟอรัส (%)	0.41			
ไลซีน (%)	1.09			
เมทไธโอนีน+ซิสตีน (%)	0.44			
ทริปโตเฟน (%)	0.22			
ทรีโอนีน (%)	0.73			

4.2 ขั้นตอนทดลอง ได้แก่

4.2.1 สุ่มสุกรเข้าทดลองตามแผนการทดลอง โดยสุ่มสุกรทดลองที่อายุ 3 สัปดาห์ คอกละ 4 ตัว จำนวน 12 คอก แต่ละคอกประกอบไปด้วยลูกสุกรเพศผู้ 2 ตัวและลูกสุกรเพศเมีย 2 ตัว โดยลูกสุกรทุกตัวได้รับวัคซีนปากและเท้าเปื่อยเพียงอย่างเดียว

4.2.2 จัดการให้อาหารทดลองแก่ลูกสุกรแต่ละคอกตามที่กำหนดในแผนการทดลอง โดยให้อาหาร 2 เวลา คือ 08.30 และ 15.00 น. ให้อาหารแต่ละครั้งปริมาณมากพอสมควรเพื่อให้สุกรสามารถกินได้อย่างเต็มที่ (*ad libitum*) และมีน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดเวลาจากที่ให้น้ำอัตโนมัติ (จิบน้ำ) ภายในคอก

4.2.3 เก็บข้อมูลสุกรทดลอง ชั่งน้ำหนักสุกรทดลอง วันแรกก่อนการทดลองใน สัปดาห์ที่ 1 2 4 และ 7 (เมื่อสุกรมีอายุ 3 5 7 และ 10 สัปดาห์) จากนั้นเก็บตัวอย่างมูลสุกรและเก็บ ตัวอย่างเลือดสุกรในสัปดาห์ที่ 1 2 4 และ 7 ของการทดลอง ส่วนปริมาณอาหารนั้นจะชั่งปริมาณ อาหารที่เหลือทุกวัน รวมทั้งบันทึกสุกรตายของแต่ละวัน

4.2.4 การจัดการดูแลทั่วไป เช่น ทำการเก็บกวาดมูลสุกรภายในคอกออกทุกวัน และทุกๆ ตอนเช้าจะเก็บเศษอาหารที่เหลือและกวาดรางให้สะอาดก่อนให้อาหารครั้งถัดไป การปฏิบัติ เลี้ยงลูกสุกรทุกคอกมีลักษณะเดียวกัน

4.3 ข้อมูลที่เก็บรวบรวม ได้แก่

4.3.1 น้ำหนักสุกรทดลอง นำน้ำหนักสุกรในวันแรกที่ชั่งเมื่อสุกรอายุ 3 5 7 และ 10 สัปดาห์ มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโต (ADG) จาก

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (ADG, กรัม/ตัว/วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)} \times \text{จำนวนสุกร}}$$

4.3.2 ปริมาณอาหารที่กิน นำบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละสัปดาห์ตลอด การทดลอง คำนวณหาปริมาณอาหารที่กิน (Daily feed intake; FI) ในแต่ละช่วงอายุ โดยคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กิโลกรัม/ตัว/วัน)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (กิโลกรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง} \times \text{จำนวนสุกร}}$$

นำบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกิน และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงอายุ มา คำนวณหาค่าอัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) โดยคำนวณได้จาก

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (กิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)}}$$

4.3.3 จำนวนสุกรตาย นำบันทึกจำนวนสุกรตายทุกวัน มาคำนวณหาอัตราการเลี้ยงรอดในแต่ละช่วงอายุ โดยคำนวณได้จาก

อัตราการเลี้ยงรอด (%)

$$= \frac{(\text{จำนวนสุกรที่เลี้ยงในแต่ละช่วง} - \text{จำนวนสุกรตายช่วงนั้น}) \times 100}{\text{จำนวนสุกรทดลองที่ใช้ในแต่ละช่วง}}$$

4.4 ตัวอย่างมูลสุกร

สุ่มเก็บมูลสุกรเข้าละ 2 ตัว (เพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว) ในวันแรกก่อนทดลอง (สุกรอายุ 3 สัปดาห์) และในสัปดาห์ที่ 2 4 และ 7 ของการทดลอง (สุกรอายุ 5 7 และ 10 สัปดาห์) ด้วยเทคนิค Rectal swab โดยการใช้ cotton bud มา swab มูลสุกรจากทวารหนักของสุกรโดยตรง นำ cotton bud ที่มีมูลสุกรแช่เก็บใน Transport medium แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการคลินิกเซ็นทรัลแล็บ หาดใหญ่ เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* และ *Salmonella* spp. ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (Thiosulfate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar)

4.5 เจาะเลือดสุกร

เก็บตัวอย่างเลือดสุกรจากเส้นเลือด Jugular vein เข้าละ 2 ตัว (เพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว) ในวันแรกก่อนการทดลอง (อายุ 3 สัปดาห์) และสัปดาห์ที่ 2 4 และ 7 ของการทดลอง (สุกรอายุ 5 7 และ 10 สัปดาห์) ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร anticoagulant และแช่เย็น แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการคลินิกเซ็นทรัลแล็บ หาดใหญ่ เพื่อตรวจวัดค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิล ลิมโฟไซต์ และสัดส่วนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (neutrophil : lymphocyte ratio; N:L ratio) ตามวิธีการของ Widowski et al. (1989; 501-504)

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้คือ น้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่กิน อัตราการแลกเนื้อ อัตราการเลี้ยงรอด เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคท้องเสีย เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิล ลิมโฟไซต์ และสัดส่วนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (neutrophil : lymphocyte ratio; N:L ratio) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)

5. สถานที่ทดลอง

5.1 สถานที่ทดลอง

คอกสุกรทดลอง ฟาร์มคุณชวลิต ศรีสมโพธิ์ บ้านเลขที่ 125 ม.7 บ้านหนองซ้อง ตำบลกำแพงแสน อำเภอรัตนบุรี จังหวัดสงขลา

5.2 ห้องปฏิบัติการ

คลินิกเซ็นทรัลแลบ หาดใหญ่ ถนนนิพัทธ์อุทิศ 1 ตำบลหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

6. ระยะเวลาที่ดำเนินการทดลอง

ใช้เวลาในการทดลอง 7 สัปดาห์ ระหว่างวันที่ 3 มีนาคม 2557 – 21 เมษายน 2557

