

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.1 สัตว์ทดลอง

3.1.1 ใช้กระบือเพศผู้ ที่เจาะกระเพาะรูเมน จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย  $276 \pm 26$  กิโลกรัม อายุ 2 ปี 2 เดือน

3.1.2 สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอกก่อนเข้าการทดลอง

3.1.3 สัตว์ทุกตัวได้รับการฉีดวิตามินเอ ดี3 และ อี (AD<sub>3</sub>E) ก่อนเข้าการทดลอง เพื่อลดความเครียด ให้สัตว์ทุกตัวมีสุขภาพดีขึ้นและเป็นการปรับสภาพร่างกายของสัตว์ให้มีความสมบูรณ์พร้อมก่อนเข้างานทดลอง

#### 3.2 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design โดยให้ช่วงเวลาการทดลอง (Period) เป็นแถว (Row) และใช้สัตว์ทดลองคือกระบือเป็นคอลัมน์ (Column) ซึ่งมีทรีตเมนต์ (Treatment) ที่ต้องการศึกษาจำนวน 4 ทรีตเมนต์ คือ

ทรีตเมนต์ที่ 1 อาหารอัดก้อนคุณภาพสูงที่มีรำหยาบเป็นองค์ประกอบ (HQFB with CRB)

ทรีตเมนต์ที่ 2 อาหารอัดก้อนคุณภาพสูงที่มีมันเฮย์เป็นองค์ประกอบ (HQFB with CH)

ทรีตเมนต์ที่ 3 อาหารอัดก้อนคุณภาพสูงที่มีถั่วมันเฮย์เป็นองค์ประกอบ (HQFB with PCH)

ทรีตเมนต์ที่ 4 อาหารอัดก้อนคุณภาพสูงที่มีหม่อนเฮย์เป็นองค์ประกอบ (HQFB with MH)

หมายเหตุ ด้วยย่อ HQFB=high-quality feed block, CRB=coarse rice bran, CH=cassava hay, PCH=*Phaseolus calcaratus* hay, MH=mulberry hay

#### 3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

3.3.1 อาหารหยาบ เตรียมฟางหมักยูเรีย 2% + แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 2% (ULRS) โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการนวดด้วยเครื่องนวดข้าวและอัดเป็นฟ่อน นำมาเรียงเป็นชั้นลงในบ่อซีเมนต์ที่ปูรองพื้นด้วยพลาสติกสีดำละลายยูเรีย (46 %N) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำในอัตราส่วน ยูเรีย และแคลเซียมไฮดรอกไซด์อย่างละ 2 กิโลกรัม ต่อน้ำ 100 กิโลกรัม หลังจากนั้นราดลงบนฟาง 100 กิโลกรัมให้ทั่ว ทำอย่างนี้เป็นชั้นๆ ตามปริมาณที่ต้องการหมัก หลังจากนั้นใช้พลาสติกสีดำคลุมบน

กองฟางอย่างมิดชิด ใช้เวลาในการหมักอย่างน้อย 10 วัน จึงทำการเปิดเพื่อนำมาให้สัตว์กิน และปิดให้สนิททุกครั้งเพื่อรักษาคุณภาพของฟางหมักยูเรีย

แผนผังการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แผนผังการทดลอง

ระยะการทดลอง	สัตว์ทดลอง			
	1	2	3	4
1	T1	T2	T3	T4
2	T2	T3	T4	T1
3	T4	T1	T2	T3
4	T3	T4	T1	T2

3.3.2 เตรียมมันเฮย์ โดยเก็บเกี่ยวต้นมันสำปะหลังซึ่งประกอบด้วยส่วนของต้น ก้าน และใบ หลังจากปลูกได้ 3-4 เดือน และหลังจากนั้นเก็บเกี่ยวทุกๆ 2-3 เดือน โดยหักสูงจากพื้นดิน 3-6 นิ้ว ต้นมันที่ได้นำไปสับและตากแดดนาน 2-3 วัน กลับไป-มา จนแห้งสนิท บรรจุกระสอบไว้ใช้ต่อไป

3.3.3 เตรียมถั่วมันเฮย์ โดยเก็บเกี่ยวถั่วมันทั้งต้นที่อายุ ประมาณ 3 เดือนจากนั้นนำไปตากแดดเป็นเวลา 2 วัน จนแห้งสนิท บรรจุกระสอบไว้ใช้ต่อไป

3.3.4 เตรียมหม่อนเฮย์ โดยเก็บเกี่ยวต้นหม่อนซึ่งประกอบด้วยส่วนของยอด ก้าน และใบ หลังจากปลูกได้ 2 เดือน จากนั้นนำไปสับและตากแดดนาน 2 วัน บรรจุกระสอบไว้ใช้ต่อไป

3.3.5 เตรียมอาหารก่อนคุณภาพสูง อาหารก่อนคุณภาพสูงมี 4 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรจะแตกต่างกันที่แหล่งโปรตีนคือ สูตรที่ 1 ใช้ รำหยาบ สูตรที่ 2 ใช้ มันเฮย์ สูตรที่ 3 ใช้ ถั่วมันเฮย์ และสูตรที่ 4 ใช้ หม่อนเฮย์

### 3.4 อาหารและการให้อาหาร

การให้อาหารสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ระยะดังนี้

3.4.1 ระยะเวลาปรับสัตว์ทดลอง (preliminary period) กระบือทุกตัวจะได้รับอาหารหยาบคือ ฟางหมักยูเรีย 2%+Ca(OH)<sub>2</sub> 2% และมีน้ำสะอาดให้สัตว์กินตลอดเวลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเริ่มงานทดลอง เพื่อปรับสัตว์และจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนให้คุ้นเคยกับอาหารและคอก และชั่งน้ำหนักก่อนทำการทดลอง

3.4.2 ระยะเวลาทดลอง (experimental period) แบ่งเป็น 4 ระยะการทดลอง แต่ละระยะการทดลอง ใช้เวลา 21 วัน โดย 14 วันแรก สัตว์จะถูกขังในกรงเดี่ยว และ 7 วันสุดท้ายนำสัตว์ขึ้นกรงเมแทโบลิซึม เพื่อทำการเก็บมูลและปัสสาวะทั้งหมด กระบือทุกตัวจะได้รับอาหารหยาบคือ ฟางหมักยูเรีย 2%+ Ca(OH)<sub>2</sub> 2% เป็นอาหารหยาบแบบเต็มที และเสริมด้วยอาหารก่อนคุณภาพสูง ตามทริทเมนต์

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหารก่อนคุณภาพสูงที่ใช้ในงานทดลอง

ส่วนประกอบ, % โดยน้ำหนัก	HQFB with			
	CRB	CH	PCH	MH
รำหยาบ (CRB)	30	-	-	-
มันเฮย์ (CH)	-	30	-	-
ถั่วมันเฮย์ (PCH)	-	-	31	-
หม่อนเฮย์ (MH)	-	-	-	32
กากน้ำตาล	40	42	40	40
ยูเรีย	13	11	12	11
ซีเมนต์	12	12	12	12
ซัลเฟอร์	1	1	1	1
Mineral premix <sup>1</sup>	1	1	1	1
เกลือ	1	1	1	1
ไขสัตว์	2	2	2	2
รวม	100	100	100	100
องค์ประกอบทางเคมี, %				
CP	37.8	38.8	38.9	38.3
TDN	56.5	55.0	56.6	55.0
Cost, baht/kg	6.27	5.20	5.22	5.20

HQFB=high-quality feed block, CRB= coarse rice bran, CH= cassava hay, PCH= *Phaseolus calcaratus* hay, MH= mulberry hay, CP = crude protein, TDN =total digestible nutrient

<sup>1</sup>Mineral and vitamins (each kg contains: Vitamin A: 10,000,000 IU; Vitamin E: 70,000 IU; Vitamin D: 1,000,000 IU; Fe: 50g; Zn: 40g; Mn: 40g; Co: 0.1g; Cu: 10 g; Se: 0.1 g; I: 0.5g.

สูตรอาหารก่อนคุณภาพสูงที่ใช้ในงานทดลองสูตรที่ 1 คือสูตรที่ใช้รำหยาบเป็นส่วนประกอบ ใช้เพื่อเป็นสูตรควบคุม (control) ในงานทดลอง ซึ่งเป็นสูตรที่ได้ทำการทดลองจากนักวิจัยมาแล้ว



(สราวุธ, 2545) ส่วนอาหารก่อนคุณภาพสูงสูตรอื่นใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับสูตรควบคุม โดยสูตรที่ 2, 3 และ 4 ได้นำแหล่งโปรตีนจากพืชซึ่งประกอบด้วย มันเฮย์ ถั่วมันเฮย์ และหม่อนเฮย์ตามลำดับ เพื่อนำมาทดแทนการใช้รำหยาบในสูตรเดิม

### 3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.5.1 ก่อนเข้าการทดลองทำการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอก และทำการฉีดวิตามินเอ คี3 และ อี ให้สัตว์ทุกตัว

3.5.2 ระยะเวลาปรับสัตว์ก่อนเข้าทดลอง ให้สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางหมักฟางหมักยูเรีย 2% + แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 2% แบบเต็มที และให้อาหารก่อนคุณภาพสูงตามทริทเมนต์ที่สัตว์ได้รับในคอกทดลองเป็นเวลา 10 วัน เพื่อเป็นการปรับสัตว์ให้คุ้นเคยกับอาหารและคอกทดลอง

3.5.3 สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับอาหารก่อนตามทริทเมนต์ที่กำหนดในแต่ละช่วงของการทดลอง และได้รับฟางหมักยูเรีย 2% + แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 2% แบบเต็มที

### 3.6 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

3.6.1 บันทึกปริมาณการกินได้ของอาหารหยาบและอาหารก่อนคุณภาพสูง โดยชั่งน้ำหนักก่อนให้และอาหารที่เหลือ บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์โดยทำการชั่งน้ำหนักก่อนเข้าช่วงการทดลอง (period) และในวันที่ 14 ก่อนสัตว์ทดลองอยู่บนกรงเมแทบอลิซึม และในวันที่ 21 หลังจากอยู่บนกรงเมแทบอลิซึมของทุกระยะการทดลอง เพื่อใช้ในการคำนวณการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก (weight change) ของสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงการทดลอง เพื่อใช้ในการคำนวณการให้อาหารและคำนวณปริมาณการกินได้

3.6.2 สุ่มเก็บตัวอย่างอาหาร โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาหารในระหว่างการทดลองทุก ๆ ระยะการทดลอง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (Dry matter) เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีการของ AOAC (1990) วิเคราะห์หาส่วนประกอบของเยื่อใย ได้แก่ ผนังเซลล์หรือเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง (neutral-detergent fiber, NDF) และเซลลูโลส-ลิกนินหรือเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid-detergent fiber, ADF) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) เพื่อคำนวณปริมาณการกินได้ของโภชนะ

3.6.3 เก็บตัวอย่างมูลจากสัตว์ทุกตัวในแต่ละระยะการทดลองใน 5 วันสุดท้ายที่สัตว์อยู่บนกรงเพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่นเดียวกับกับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารสัตว์ เพื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะปรากฏ ตามวิธีการของ Schneider and Flatt (1975)

3.6.4 ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจาก jugular vein จากกระบือแต่ละตัวในชั่วโมงที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังการกินอาหารตอนเช้าของวันสุดท้ายในแต่ละระยะการทดลอง เพื่อนำมาวิเคราะห์หา ยูเรีย-ไนโตรเจนในกระแสเลือด (blood urea nitrogen, BUN) ตามวิธีการของ Crocker (1967)

3.6.5 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในชั่วโมงที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังการกินอาหารตอนเช้าของวันสุดท้ายในแต่ละระยะการทดลองจากกระบือแต่ละตัว

3.6.6 สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนในชั่วโมงที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังการกินอาหารตอนเช้าของวันสุดท้ายในแต่ละระยะการทดลองจากกระบือแต่ละตัว และแบ่งตัวอย่างของเหลวออกเป็น 2 ส่วน

- ส่วนที่หนึ่งนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965) และนำมาวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (volatile fatty acid, VFA) โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp.) โดยดัดแปลงตามวิธีของ Samuel et al. (1997)

- ส่วนที่สอง นำมาศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมน ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา โดยวิธีการนับตรง (direct count method) และทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อนับจำนวนของโคโลนิของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม โดยใช้ roll tube technique ตามวิธีการของ Hungate (1969) (เฉพาะชั่วโมงที่ 0 และ 4) ซึ่งแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่ศึกษา ได้แก่ แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic bacteria) แบคทีเรียที่ย่อยแป้ง (Amylolytic bacteria) และแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable bacteria) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เฉพาะต่อแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม ตามรายละเอียดของ Hobson (1969)

3.6.7 เก็บตัวอย่างปัสสาวะใน 5 วันสุดท้าย ของในแต่ละช่วงของการทดลอง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ N และอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivative) เพื่อใช้ในการประเมินการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีน โดยการใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp.) ดัดแปลงตามวิธีของ Resines et al., (1992)

### 3.7 วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดย General Linear Model (GLM) ตามแผนการทดลอง 4 X 4 Latin square design โดยใช้โปรแกรมทางสถิติของ SAS (1996) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีของ Steel and Torrie (1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

$Y_{ijk}$	$= \mu + R_i + C_j + T_k + \epsilon_{ijk}$
เมื่อ $Y_{ijk}$	$=$ ค่าสังเกตจากช่วงเวลาทดลองที่ $i$ สัตว์ทดลองที่ $j$ ทริทเมนต์ที่ $k$
$\mu$	$=$ ค่าเฉลี่ยทั้งหมด
$R_i$	$=$ อิทธิพลเนื่องจากช่วงเวลาทดลองที่ $i$ เมื่อ $i = 1$ ถึง $4$
$C_j$	$=$ อิทธิพลเนื่องจากสัตว์ทดลองที่ $j$ เมื่อ $j = 1$ ถึง $4$
$T_k$	$=$ อิทธิพลเนื่องจากทริทเมนต์ที่ $k$ เมื่อ $k = 1$ ถึง $4$
$\epsilon_{ijk}$	$=$ Error

### 3.8 สถานที่ทำการวิจัย

3.8.1 หมวดโคนเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.2 ศูนย์เมทาโบลิซึมศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.3 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.4 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น