

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ตั้งแต่เดือน กันยายน พ.ศ. 2547 ถึงเดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2549

เริ่มดำเนินการทดลอง วันที่ 1 มกราคม 2548

เสร็จสิ้นการทดลอง วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2548

สถานที่ทำการทดลอง

สถานที่ทดลอง - เลี้ยงไก่ทดลอง ณ ฟาร์มสัตว์ปีก สาขาสัตว์ปีก ภาควิชาเทคโนโลยีทาง
สัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

- วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของตัวอย่างอาหาร, วิเคราะห์คอเลสเทอรอล
และตรวจนับเม็ดเลือดขาว ณ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ สาขาอาหารสัตว์ ภาควิชา
เทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

- ชั่งสูตรซาก ณ ห้องปฏิบัติการกายวิภาคและสรีรวิทยาทางสัตว์
อาคารปฏิบัติการสัตว์ปีกและสุกร ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์การทดลอง

1. ใช้ไก่กระทงทะเลเทศอายุ 1 วัน จำนวน 160 ตัว (เพศผู้ 80 ตัว, เพศเมีย 80 ตัว)
2. ผลมะระขึ้นกแห้งบดละเอียด
3. เครื่องชั่งน้ำหนักไก่กระทง และอาหาร ขนาด 7 กิโลกรัม จำนวน 1 เครื่อง เครื่องชั่งดิจิตอล จำนวนหนึ่งเครื่อง
4. โรงเรือนสำหรับเลี้ยงไก่กระทง 1 หลัง พร้อมถังอาหาร กระปุกน้ำ
5. อุปกรณ์จัดบันทึก เช่น ปากกา ดินสอ สมุด ไม้บรรทัด เป็นต้น
6. เครื่องมือในการเก็บตัวอย่างเลือด
7. เครื่องมือพร้อมสารเคมีในการวิเคราะห์หาคอเลสเตอรอล
8. กล้องถ่ายรูปจำนวน 1 ชุด
9. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเสมียร์เลือด
10. อุปกรณ์ที่ใช้ในการนับเม็ดเลือดขาว
11. กล้องจุลทรรศน์
12. ป्लอกขาใช้ในการแยกไก่กระทงเพศผู้และเพศเมีย
13. อุปกรณ์การฆ่าและถอนขน
14. อุปกรณ์การผ่าซาก
15. เพลต และขวดสำหรับใส่ไขมันช่องท้อง
16. น้ำกลั่นและโซเดียมคลอไรด์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ คอก และอาหารทดลอง

ใช้ไก่กระทองแยกเพศ อายุ 1 วัน จำนวน 160 ตัว (เพศผู้ 80 ตัว, เพศเมีย 80 ตัว) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 ทรีทเมนต์ และ 4 ซ้ำ ซึ่งแต่ละซ้ำได้ใช้ไก่กระทอง 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว, เพศเมีย 5 ตัว) สูตรอาหารทดลองที่ใช้มี 4 สูตรคือ สูตรที่ 1, 2, 3, 4 ใช้ผลมะระขึ้นกดิบอบแห้งบดเสริมอาหารในระดับ 0, 0.05, 0.5, 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อาหารที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น 2 ระยะคือ ระยะ 0-3 สัปดาห์ และ 3-6 สัปดาห์ ในแต่ละระยะมีโปรตีนระดับ 21 และ 19 เปอร์เซ็นต์เท่ากันทุกกลุ่มและมีพลังงาน 3,150 กิโลแคลอรี/กิโลกรัม เหมือนกันทุกระยะ ไก่ทุกตัวได้รับการกินน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ ซึ่งพื้นที่คอกในแต่ละซ้ำมีขนาด 1x1 เมตร ปูแกลบหนา 5 เซนติเมตร และมีการกลับแกลบทุกสัปดาห์

2. การบันทึกข้อมูล

2.1 การศึกษาด้านสมรรถภาพการผลิต

ทำการบันทึกน้ำหนักตัวตั้งแต่แรกเลี้ยง จนถึงน้ำหนักตัวทุก ๆ สัปดาห์ ตั้งแต่น้ำหนักเริ่มต้นจนถึงน้ำหนักเสร็จสิ้นการทดลอง 42 วัน และทำการบันทึกอัตราการตาย ปริมาณอาหารที่กิน และอาหารที่เหลือทุกสัปดาห์ เพื่อคำนวณปริมาณอาหารที่กินต่อวัน (daily feed intake) คำนวณอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain, ADG) และอัตราแลกเปลี่ยนอาหาร (feed conversion ratio, FCR)

2.2 การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาว

ทำการคัดเลือกไก่กระทองเพศผู้และเพศเมียที่อายุ 42 วัน จากค่าน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละซ้ำ ๆ ละตัวเพื่อเก็บตัวอย่างเลือด โดยแยกเป็นเพศผู้และเพศเมีย นำเลือดที่ได้มาทำการสเมียร์เพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดตามวิธีของ คู่มือโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ (2524) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสไลด์ สไลด์ต้องเรียบไม่มีรอยขีดข่วนโดยความสะอาดของสไลด์เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง แม้เป็นสไลด์ใหม่ที่ยังไม่ได้ใช้งานก็ต้องทำความสะอาดเสียก่อน โดยล้างด้วยสบู่

หรือผงซักฟอก เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บในภาชนะที่สะอาดปราศจากฝุ่นละออง เวลาหยิบให้จับเฉพาะที่ขอบ และต้องไม่ให้นิ้วแตะที่พื้นผิวสไลด์เป็นอันขาด เพราะไขมันจะทำให้เลือดไม่แผ่กระจายอย่างสม่ำเสมอ

2. การสเมียร์ ใช้วิธี Wedge smear เป็นวิธีที่ง่าย และนิยมใช้กันมากที่สุด โดยหยดเลือด 1 หยดลงบน glaSS slide ที่ปลายสไลด์อีกด้านหนึ่ง แล้วใช้สไลด์อีกอันหนึ่งที่ขอบเรียบ และที่หยดเลือดทำมุมประมาณ 30-45 องศา กับแผ่นสไลด์แผ่นแรก โดยรอให้เลือดกระจายไปใกล้ขอบสไลด์แล้วจึงไถสไลด์ไปข้างหน้าอย่างสม่ำเสมอ สเมียร์ที่ดีต้องไม่หนาไม่บางเกินไป ผิวเรียบไม่เป็นคลื่นหรือเป็นดวง ๆ ถ้าเป็นดวงหมายถึงปลายสไลด์ไม่สะอาด และปลายสไลด์ต้องสิ้นสุดลงประมาณ 2/3 ของความยาวสไลด์ ถ้าใช้เลือดหยดใหญ่ สเมียร์จะหนาและปลายหมดใกล้ขอบหรือตกขอบสไลด์ ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจนับ เพราะส่วนปลายของสเมียร์เป็นส่วนที่สำคัญที่จะต้องตรวจ

3. การย้อมสี หลังจากที่ปล่อยให้สไลด์ที่สเมียร์แห้งดีแล้วในอุณหภูมิห้อง นำสไลด์มาย้อมสีด้วย Wright-GieMSa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาย้อมในสี และ buffer pH 6.0 5 นาที และนำมาล้างด้วย buffer pH 6.0 ประมาณ 3 ครั้ง

4. การตรวจสเมียร์ เริ่มต้นตรวจสเมียร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายขนาด 10X ก่อนทำการประเมินคุณภาพของสเมียร์นั้น ๆ ว่ามีคุณภาพดี ดิดีดี รวมทั้งสภาพทั่วไปเกี่ยวกับการกระจายของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ถ้าตรวจพบ fibrin strands แสดงว่าเลือดบางส่วนแข็งตัวก่อนทำการสเมียร์ และจะจับกับเม็ดเลือดขาวกับเกล็ดเลือดไว้ส่วนหนึ่งทำให้การประเมินสเมียร์แผ่นนี้ไม่แม่นยำต้องทำสเมียร์แผ่นใหม่ และเมื่อสเมียร์ใช้ได้แล้ว นำไปตรวจแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว โดยบริเวณที่เหมาะสมแก่การตรวจนับคือบริเวณที่ถัดจากปลายหรือส่วนหางของสเมียร์เข้ามาเล็กน้อยเลือกบริเวณนี้แล้วทำการเปลี่ยนกำลังขยายเป็น 100X และทำการตรวจนับเม็ดเลือดขาวจำนวน 100 เซลล์ และรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แต่ละชนิดที่พบ

2.3 การศึกษาคอเลสเทอรอลในเลือด

หลังจากทำการเตรียมเลือดที่จะทำการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดเสร็จ เลือดที่เหลือก็นำมาเก็บในหลอดเก็บเลือดเพื่อนำตัวอย่างเลือดไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอลต่อ โดยใช้วิธีของ วรรณรัตน์ (2545) ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

1. เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น หลอดที่ 2 เติมสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล หลอดที่ 3 และ 4 เติมพลาสมาที่ต้องการวิเคราะห์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

2. เติม isopropanol หลอดละ 5 มิลลิกรัม เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

3. นำเฉพาะหลอดที่บรรจุพลาสมาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดเอาเฉพาะส่วนใส 1 มิลลิลิตร มาใส่หลอดทดลองใหม่

4. เติม glacial acetic acid 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม iron reagent 0.3 มิลลิลิตร ตามด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายแต่ละหลอดให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสมแบบสันสะเทือน (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ แล้วคำนวณความเข้มข้นของคอเลสเทอรอลในพลาสมา

$$\text{คอเลสเทอรอลรวมเป็น มก./100 มล.} = \frac{\text{Au} \times C_s}{\text{As}}$$

เมื่อ Au เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากปริมาณคอเลสเทอรอลในพลาสมา

As เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล

C_s เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล (200 มก./100 มล.)

2.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงไขมันช่องท้อง

ไก่กระທงที่ถูกั้ดเลือกเพื่อเก็บตัวอย่างเลือด ถูกนำไปฆ่าเพื่อนำไปหาน้ำหนักของไขมันช่องท้องที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง รวมทั้งน้ำหนักที่ได้คำนวณเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไขมันช่องท้อง โดยเปรียบกับน้ำหนักตัว

งบประมาณการวิจัย

รายการ

ก. หมวดค่าวัสดุและอุปกรณ์การวิจัย

1. ค่าอาหารไก่กระทง 160 ตัว รวม 640 กิโลกรัม ๆ ละ 13.5 บาท	8,700 บาท
2. ค่าผลมะระขึ้นกคิบดแห้ง 20 กิโลกรัม ๆ ละ 200 บาท	4,000 บาท
3. ค่าวิเคราะห์การตรวจวัดคอเลสเทอรอล (รวมทั้งสารเคมี) การตรวจนับเม็ดเลือดขาว	10,400 บาท

ข. หมวดค่าใช้สอย

1. ค่าพิมพ์เอกสาร	5,000 บาท
2. ค่าพิมพ์ปกและเข้ารูปเล่มฉบับสมบูรณ์	7,000 บาท
3. พิมพ์พร้อมค่าล้างและขยายจำนวน 2 ม้วน ๆ ละ 300	600 บาท
4. ค่าวัสดุสิ้นเปลือง	3,000 บาท
5. ค่าใช้จ่ายบริหารงานทั่วไปอื่น ๆ ของการวิจัย	5,000 บาท
รวมงบประมาณ	<u>43,700 บาท</u>