

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัยครั้งนี้ เริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2547 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.

2549

เริ่มดำเนินการทดลอง วันที่ 1 กันยายน 2547

เสร็จสิ้นการทดลอง วันที่ 30 ธันวาคม 2548

สถานที่ทำการทดลอง

ทำการเลี้ยงสุกรทดลอง ณ ฟาร์มสุกร สาขาการผลิตสุกร ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว
คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

ทำการตรวจวิเคราะห์โภชนะในอาหาร ณ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ สาขาอาหาร
สัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย
จังหวัดเชียงใหม่

อุปกรณ์การวิจัยและวิธีการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. ใช้สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ดอร์ค x ลาร์จไวท์ - แลนด์เรซ) ในการทดลองจำนวน 54 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นการทดลองประมาณ 30 กิโลกรัม เป็นเพศผู้ตอน 36 ตัว และ เพศเมีย 18 ตัว
2. อาหารสำหรับสุกรรุ่นน้ำหนัก 30-60 กิโลกรัม มีโปรตีนรวม 16 เปอร์เซ็นต์ มีพลังงาน 3,150 Kcal ME/kg และสุกรขุนน้ำหนัก 60-90 กิโลกรัม มีโปรตีนรวม 14 เปอร์เซ็นต์ มีพลังงาน 3,100 Kcal ME/kg มีกรดอะมิโนที่จำเป็น แร่ธาตุ และวิตามิน ไม่ต่ำกว่าตามคำแนะนำของ NRC (1998) รวมอาหารสุกรจำนวนประมาณ 9,300 กิโลกรัม
3. เปลือกกุ้งป่น จำนวน 390 กิโลกรัม

4. เครื่องชั่งน้ำหนักสุกร ขนาด 500 กิโลกรัม (ละเอียดย 100 กรัม) จำนวน 1 เครื่อง เครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 50 กรัม (ละเอียดย 0.01 กรัม) จำนวน 1 เครื่อง

5. กรงทดลองขนาด 1.5x2.0 ตารางเมตร พร้อมอุปกรณ์ให้น้ำและอาหารแบบอัตโนมัติ และอุปกรณ์ในการเลี้ยง เช่น ที่คักอาหาร อุปกรณ์ทำความสะอาดและอื่น ๆ จำนวน 18 กรง

6. กรงทดลองหาความย่อยได้ (metabolism cage) พร้อมอุปกรณ์ให้น้ำอัตโนมัติ จำนวน 6 กรง

7. อุปกรณ์การจดบันทึก เช่น กระดาษ ดินสอ ปากกา สมุด ไม้บรรทัด เป็นต้น

8. เครื่องมือในการเก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 108 ชุด

9. เครื่องมือพร้อมสารเคมีในการวิเคราะห์หาคอเลสเตอรอล

10. ผู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 1 ตู้

11. เครื่องมือพร้อมสารเคมีในการวิเคราะห์หาปริมาณโภชนะในอาหารและมูล ด้วยวิธีการ proximate analysis

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาทดลองครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการย่อยได้ของอาหารที่เสริมด้วยเปลือกกุ้ง

ทำการทดลอง 2 ระยะ เมื่อสุกรมีขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 30 กิโลกรัม จำนวน 18 ตัว และน้ำหนักตัวประมาณ 60 กิโลกรัม จำนวน 18 ตัว โดยใช้สุกรเพศผู้ตอน ลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ดуро x ลาร์จไวท์ - แลนด์เรซ) ทำการสุ่มสุกรทดลองเข้าเลี้ยงในคอกหาการย่อยได้ (metabolic cages) โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Blocks Design (RCBD) แบ่งเป็น 6 กลุ่ม (treatment) ซึ่งประกอบด้วยสูตรอาหาร 6 สูตร และมี 3 blocks ดังมีรายละเอียดดังนี้

สูตรอาหารสุกรรุ่นขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 30 กิโลกรัม อาหารมีโปรตีนรวม 16 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 3,150 Kcal ME/kg จำนวน 6 สูตรคือ

สูตรที่ 1 อาหารไม่ผสมเปลือกกุ้ง (control)

สูตรที่ 2 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 3.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 4.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 5.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 6.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 6 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 7.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรอาหารสุกรขุนขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 60 กิโลกรัม อาหารมีโปรตีนรวม 14 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 3,100 Kcal ME/kg จำนวน 6 สูตรคือ

สูตรที่ 1 อาหารไม่ผสมเปลือกกุ้ง (control)

สูตรที่ 2 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 3.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 4.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 5.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 6.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 6 อาหารผสมเปลือกกุ้ง 7.00 เปอร์เซ็นต์

สูตรอาหารให้กับสุกรทดลองในกลุ่ม โดยแบ่งได้ 6 กลุ่มการทดลอง ซึ่งแต่ละกลุ่มจะใช้ระยะเวลาในการทดลอง 7 วัน โดยข้อมูลที่ได้จะแตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้ทำการทดลอง ซึ่งในการทดลองการย่อยได้จะใช้เวลาในการปรับสูตรอาหาร 4 วัน ก่อนเก็บข้อมูล เพื่อให้สุกรคุ้นเคยกับอาหารแล้วจึงจะเก็บข้อมูลในวันที่ 5-7 โดยสุกรได้รับอาหารวันละ 2 เวลา (07.00 น. และ 16.30 น.) ให้กินเต็มที่ประมาณ 1 ชั่วโมง และให้น้ำอย่างเต็มที่ตลอดเวลา ทำการจดบันทึกข้อมูลการกินของอาหารที่ให้ และทำการเก็บมูลของสุกรทดลองทุกตัว โดยจะเก็บใน 3 วันสุดท้ายของสัปดาห์ มูลแยกใส่ถุงปิดให้สนิทและเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ชั่งน้ำหนักและนำเข้าเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

การวิเคราะห์ทางเคมี นำมูลสุกรที่ได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หรือตากแดดเป็นเวลา 2-3 วัน ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับอาหารทดลอง โดยการวิเคราะห์หาปริมาณโภชนะต่าง ๆ ในอาหารทดลองและมูลสุกรด้วยวิธีการ proximate analysis (นรินทร์ และเผ่าพงษ์, 2540) และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าการย่อยได้ของโภชนะชนิดต่าง ๆ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานำมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน ถ้าค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ จะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเจริญเติบโตและระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของสุกร

ใช้สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ครอก x ลาร์จไวท์ - แลนด์เรซ) ขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 30 กิโลกรัม แบ่งเป็นเพศผู้ตอนจำนวน 18 ตัว และเพศเมียจำนวน 18 ตัว ทำการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Blocks Design (RCBD) ประกอบด้วย 6 กลุ่มทดลอง (treatment) ตามสูตรอาหาร และมี 3 blocks ทำการสุ่มสุกรทดลองเข้าเลี้ยงในคอกทดลองโดยการเข้าข้างแยก เพศผู้ตอน กับเพศเมีย คอกละ 1 ชุด และสุ่มอาหารทดลองให้สุกรทดลองในแต่ละกลุ่ม โดยใช้สูตรอาหารทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ระหว่างการเลี้ยงมีน้ำให้สุกรกินตลอดเวลา ทำการชั่งน้ำหนักตัว และจดบันทึกปริมาณการกินอาหารทุกสัปดาห์ เพื่อกำหนดน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ (FCR) และปริมาณอาหารที่กินต่อวันของสุกร เลี้ยงจนสุกรมีน้ำหนักตัวประมาณ 60 กิโลกรัมจึงเปลี่ยนเป็นสูตรอาหารระยะที่ 2 (สุกรขุน) เลี้ยงจนสุกรมีน้ำหนักตัวประมาณ 90 กิโลกรัม จึงทำการสุ่มหรือเก็บข้อมูลสุกรทั้งหมด เพื่อกำหนดหาปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด น้ำหนักสุดท้าย จากนั้นทำการฆ่าชำแหละและศึกษาคุณภาพซากต่อไป ซึ่งสุกรทดลองทั้ง 2 ระยะจะได้รับการปฏิบัติดูแลเหมือนกันทุกอย่างตลอดการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเลือดสุกร ทำการเก็บ 3 ครั้งโดยทำการเก็บในช่วงสุกรน้ำหนักประมาณ 30 กิโลกรัม 60 กิโลกรัม และ 90 กิโลกรัม โดยเก็บตรงบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ และนำเข้าเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

การวิเคราะห์หาระดับคอเลสเตอรอล ทำโดยใช้วิธีของ วรรณรัตน์ (2545) ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

1. เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น หลอดที่ 2 เติมสารละลายมาตรฐานคอเลสเตอรอล หลอดที่ 3 และ 4 เติมพลาสมาที่ต้องการวิเคราะห์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
2. เติม isopropanol หลอดละ 5 มิลลิลิตร 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 ผสมสารละลายแต่ละหลอดให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบสันสะท้อน (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ แล้วคำนวณความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลในพลาสมา

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

- เมื่อ Au เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากปริมาณคอเลสเทอรอลในพลาสมา
 As เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล
 C_s เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคอเลสเทอรอล (200 มก./100 มล.)

การวิเคราะห์หาระดับไตรกลีเซอไรด์ทำได้โดยใช้วิธีของ วรรณรัตน์ (2545) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

1. เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น หลอดที่ 2 เติมสารละลายมาตรฐานไตรโอเลอิน หลอดที่ 3 และ 4 เติมพลาสมาที่ต้องการวิเคราะห์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
2. เติม isopropanol หลอดละ 5 มิลลิลิตร และผงอะลูมินา (alumina) หลอดละประมาณ 400 มิลลิกรัม (หนึ่งช้อนเล็ก) เขย่าแรง ๆ หลาย ๆ ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
3. นำหลอดทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดเอาเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาใส่หลอดทดลองใหม่ 4 หลอด
4. เติม alcoholic KOH 0.6 มิลลิลิตร ลงในสารละลายใสแต่ละหลอด นำไปแช่ในอ่างอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เติมสารละลาย sodium periodate หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
6. เติมสารละลาย acetylacetone หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน นำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแต่ละหลอดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ แล้วคำนวณความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา

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

- เมื่อ Au เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา
 As เป็นค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์
 C_s เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์ (200 มก./100 มล.)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในสูตรอาหารสุกรทดลอง สุกรรุ่น (ระยะ 30–60 กิโลกรัม)

รายการวัตถุดิบ	สูตรอาหารทดลอง (กิโลกรัม)					
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6
ข้าวโพด	37.45	37.30	37.04	37.09	36.51	36.24
ปลายข้าว	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
รำละเอียด	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
เปลือกกุ้งบดละเอียด	0.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00
กากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์	15.05	12.70	11.96	11.16	10.49	9.76
ปลาป่น 60 เปอร์เซ็นต์	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
ไขมันสัตว์	2.00	2.00	2.00	2.00	2.25	2.25
ไคแคลเซียม	1.50	1.00	1.00	0.75	0.75	0.75
แอล-ไลซีน	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
ดีแอล-เมทไธโอนีน	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
เกลือ	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
พรีมิกซ์	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
รวม	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ส่วนประกอบทางเคมีโดยการคำนวณ (เปอร์เซ็นต์)						
โปรตีน	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
แคลเซียม	0.66	0.63	1.03	1.09	1.21	1.33
ฟอสฟอรัส	0.69	0.63	0.64	0.60	0.61	0.62
ไลซีน	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
เมทไธโอนีน + ซีสทีน	0.73	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74
ทรีปโตเฟน	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17
ทรีโอนีน	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
พลังงาน Kcal ME/kg	3149	3143	3137	3137	3145	3138

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในสูตรอาหารสุกรทดลอง สุกรขุน (ระยะ 60-90 กิโลกรัม)

รายการวัตถุดิบ	สูตรอาหารทดลอง (กิโลกรัม)					
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6
ข้าวโพด	44.56	44.09	43.83	43.89	43.30	43.36
ปลายข้าว	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
รำละเอียด	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
เปลือกกุ้งบดละเอียด	0.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00
กากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์	8.44	6.16	5.42	4.61	3.95	3.14
ปลาป่น 60 เปอร์เซ็นต์	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
ไขมันสัตว์	1.75	1.75	1.75	1.75	2.00	2.00
ไคแคลเซียม	1.25	1.00	1.00	0.75	0.75	0.50
แอล-ไลซีน	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
ดีแอล-เมทไธโอนีน	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
เกลือ	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
พรีมิกซ์	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
รวม	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ส่วนประกอบทางเคมีโดยการคำนวณ (เปอร์เซ็นต์)						
โปรตีน	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
แคลเซียม	0.58	0.89	1.01	1.07	1.20	1.26
ฟอสฟอรัส	0.69	0.67	0.68	0.65	0.66	0.62
ไลซีน	0.85	0.85	0.85	0.84	0.84	0.84
เมทไธโอนีน + ซีสทีน	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
ทรีปโตเฟน	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14
ทรีโอนีน	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51
พลังงาน Kcal ME/kg	3100	3088	3082	3082	3089	3090