

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์และอาหารทดลอง

ใช้โคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein Friesian Crossbred) ระดับสายเลือด 85.9 ± 7.9 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัวเริ่มต้น 398.8 ± 58.9 กิโลกรัม จำนวนวันที่ให้นม (day in milk, DIM) 30.3 ± 2.9 วัน ผลผลิตน้ำนมก่อนเข้าการทดลอง 13.8 ± 2.9 กิโลกรัมต่อวัน ทำการถ่ายพยาธิภายนอกและภายใน และฉีดไวยาตามินเอดีอี ก่อนเข้าการทดลอง 1 สัปดาห์ จากนั้นสุมโคนมให้ได้รับอาหารทดลอง คือสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป ดังนี้

สูตรอาหารผสมสำเร็จรูป40 (TMR40) = ถั่วคาวาลเคดแห้ง:อาหารชั้น 40:60

สูตรอาหารผสมสำเร็จรูป50 (TMR50) = ถั่วคาวาลเคดแห้ง:อาหารชั้น 50:50

สูตรอาหารผสมสำเร็จรูป60 (TMR60) = ถั่วคาวาลเคดแห้ง:อาหารชั้น 60:40

สูตรอาหารผสมสำเร็จรูป70 (TMR70) = ถั่วคาวาลเคดแห้ง:อาหารชั้น 70:30

โคนมแต่ละตัวถูกแยกขังในคอกเดี่ยวขนาด 2x4 เมตร พื้นคอนกรีต มีที่ให้อาหารแยกแต่ละตัว โดยมีน้ำสะอาด และแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา

สูตรอาหารผสมสำเร็จรูปคำนวณให้มีโภชนะตามความต้องการของโคนมที่ให้น้ำนมเฉลี่ย 10-15 กิโลกรัมต่อวัน ไขมันนม 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีระดับโปรตีนหยาบ 14 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 2.5 McalME/kgDM (NRC, 1989) สำหรับการเตรียมสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป ทำโดยการบดถั่วคาวาลเคดแห้งผ่านตะแกรงขนาด 1 เซนติเมตร แล้วนำไปผสมกับส่วนผสมวัตถุดิบอาหารชั้น ตามสัดส่วนที่ได้กำหนดไว้ (ตารางที่ 3.1)

3.2 แผนการทดลอง

สุมโคนมเข้าทดลองตามแผนการทดลอง 4x4 ลาตินสแควร์ (Latin square design) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ช่วงเวลาการทดลอง (period) แต่ละระยะทดลองใช้เวลา 21 วัน มีระยะปรับสัตว์ก่อนเข้างานทดลอง 7 วัน และระยะพักระหว่างช่วงการทดลอง 5 วัน ในแต่ละช่วงเวลาการทดลองมีอาหารครบทั้ง 4 สูตร เมื่อทดลองครบหนึ่งช่วงเวลาการทดลอง โคนมแต่ละตัวจะถูกเปลี่ยนไปรับทรีทเมนต์อื่นโดยไม่ซ้ำกัน จนครบทั้ง 4 สูตร ดังมีการให้อาหารทดลองตามแผนผังการทดลอง (Lay out) ต่อไปนี้

	สัตว์ตัวที่ 1	สัตว์ตัวที่ 2	สัตว์ตัวที่ 3	สัตว์ตัวที่ 4
ช่วงเวลาการทดลองที่ 1	TMR40	TMR50	TMR60	TMR70
ช่วงเวลาการทดลองที่ 2	TMR50	TMR60	TMR70	TMR40
ช่วงเวลาการทดลองที่ 3	TMR70	TMR40	TMR50	TMR60
ช่วงเวลาการทดลองที่ 4	TMR60	TMR70	TMR40	TMR50

ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ, %วัตถุดิบ	TMR40	TMR50	TMR60	TMR70
ถั่วคาวาลเคดแห้ง	40.0	50.0	60.0	70.0
ไขมันปาล์ม	2.3	3.0	3.4	3.9
กากน้ำตาล	4.4	4.4	4.4	4.4
มันเส้น	15.1	15.1	15.1	15.1
รำอ่อน	15.3	8.6	6.0	2.2
กากปาล์มน้ำมัน	16.5	13.2	6.5	1.5
กากถั่วเหลือง	3.9	3.1	1.9	0.0
ยูเรีย	0.7	0.8	0.9	1.1
ไคแคลเซียม-ฟอสเฟต	0.4	0.4	0.4	0.4
เกลือ	0.4	0.4	0.4	0.4
ซัลเฟอร์	0.3	0.3	0.3	0.3
แร่ธาตุ	0.7	0.7	0.7	0.7
รวม	100.0	100.0	100.0	100.0
ราคา ¹ , บาท/กิโลกรัม	5.44	5.36	5.25	5.08

¹ เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548

3.3 แผนการดำเนินงาน

3.3.1 การให้อาหารสัตว์ทดลอง

จัดให้โคนมแต่ละตัวได้รับสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่มีสัดส่วนของถั่วคาวาลเคดแห้งระดับต่าง ๆ แบบเต็มที่ (ad libitum) แบ่งให้วันละ 3 เวลา คือ ในเวลาหลังรีดนมเช้า (6.30 น.) เทียง (11.30 น.) และหลังรีดนมเย็น (16.00 น.) ปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละครั้งจะชั่งน้ำหนักก่อน และอาหารที่เหลือจะชั่งออกทุกวันก่อนให้อาหารใหม่ในเวลาเช้าวันถัดไป เพิ่มปริมาณอาหารขึ้นหากอาหารเหลือในรางอาหารน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำสะอาดให้กินอย่างเพียงพอตลอดเวลา

3.3.2 การเก็บข้อมูล

3.3.2.1 ชั่งน้ำหนักโค สองครั้งคือ ครั้งแรกในช่วงเช้าภายหลังการรีดนม (6.30 น.) ในวันที่ 1 และครั้งที่สองในวันที่ 21 ที่เวลาเดียวกันของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง เพื่อคำนวณการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และเพื่อนำค่าน้ำหนักตัวที่ได้มาคำนวณหาปริมาณการกินได้ในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว (%BW) และกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว^{0.75} (g/kgW^{0.75})

3.3.2.2 บันทึกปริมาณการให้อาหาร ทุกวันตลอดช่วงเวลาการทดลองทั้งตอนเช้าและตอนเย็น ด้วยการชั่งน้ำหนักอาหารก่อนให้ และอาหารที่เหลือทุกครั้ง จดบันทึกปริมาณอาหารที่เหลือ และคำนวณปริมาณอาหารที่กินได้ในแต่ละวัน ซึ่งหาได้จากสมการ

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณการกินได้ต่อวัน (วัตถุแห้ง)} = \\ [\text{อาหารให้ตอนเช้า (วัตถุแห้ง)} - \text{อาหารเหลือตอนเช้า (วัตถุแห้ง)}] \\ + [\text{อาหารให้ตอนเย็น (วัตถุแห้ง)} - \text{อาหารเหลือตอนเย็น (วัตถุแห้ง)}] \end{aligned}$$

3.3.2.3 บันทึกปริมาณผลผลิตน้ำนม ทุกวันตลอดช่วงเวลาการทดลองทั้งตอนเช้าและตอนเย็น เพื่อศึกษาผลผลิตน้ำนมเฉลี่ยต่อวันของโคนม

3.3.2.4 สุ่มเก็บตัวอย่างสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปทุกสูตร ติดต่อกัน 5 วัน ในช่วงวันที่ 17 ถึง วันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter) นำค่าที่ได้ไปปรับปริมาณการกินได้โดยคิดต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง และอาหารอีกส่วนหนึ่งนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เสร็จแล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของโภชนะต่างๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash) โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) และไขมัน (ether extract, EE) ตามวิธีของ AOAC (1985) วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย ได้แก่ เยื่อใย NDF, เยื่อใย ADF และลิกนิน (acid-detergent lignin, ADL) ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970) และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) และวิเคราะห์หาโปรตีนที่ย่อยสลายได้ในกระเพาะรูเมน (rumen degradable protein, RDP) โดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส (protease enzyme) ตามวิธีการของ Coblenz et al. (1999) (ภาคผนวกที่ 1) และหาค่าความหนาแน่น (bulk density) ของสูตรอาหารแต่ละสูตร ตามวิธีการของ Khajareem and Khajareem (1999) (ภาคผนวกที่ 2)

3.3.2.5 สุ่มเก็บมูลโคนมทดลองทุกตัว โดยสุ่มเก็บติดต่อกัน 5 วันในช่วงวันที่ 17 ถึง วันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง สุ่มเก็บในช่วงเช้า โดยวิธีล้วงผ่านทวารหนัก (rectum collection) ป้องกันการปนเปื้อนของดิน และแบ่งเก็บมูลไว้ประมาณ 300 กรัมต่อครั้ง ใส่ถุงแยกเป็นรายตัว ทำเครื่องหมายให้ชัดเจน นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสให้แห้ง จนครบ 5 วัน นำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร แล้วนำมูลทั้งหมดในปริมาณที่เท่ากันมาคลุกกันทั้ง

5 วันของโคแต่ละตัว จากนั้นทำการสุ่มเก็บอีกครั้งประมาณ 10 เปอร์เซนต์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หา ส่วนประกอบของโภชนะต่างๆ ได้แก่ DM, Ash, CP, EE, NDF, ADF และ ADL เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร และวิเคราะห์หา AIA ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) เพื่อนำมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ตามวิธีของ Schnieder and Flatt (1975) โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุดิบ (\%)} = 100 - \frac{[100 \times (\% \text{AIA ในอาหาร})]}{\% \text{AIA ในมูล}}$$

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = 100 - \frac{[100 \times (\% \text{AIA ในอาหาร} \times \% \text{โภชนะในมูล})]}{\% \text{AIA ในมูล} \times \% \text{โภชนะในอาหาร}}$$

3.3.2.6 สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนม ในวันที่ 20 ตอนเย็น และตอนเช้าวันที่ 21 นำมาผสมในสัดส่วนที่เท่ากันของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง โดยเก็บปริมาณครั้งละ 50 มิลลิลิตร โดยเติมสารกันเสียโปตัสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) 500 มิลลิกรัมเก็บในขวดสีชา จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (ณัฐมา และคณะ, 2546) เพื่อวิเคราะห์หา โปรตีน (protein) ไขมัน (fat) ของแข็งทั้งหมด (total solid) ของแข็งไม่รวมไขมัน (solids not fat) และ น้ำตาลแลคโตส (lactose) โดยเครื่อง milko-scan (Model 133 V.3. 7 GB.) และนำอีกส่วนหนึ่งปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกไขมันออก และเก็บส่วนใสรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หา ยูเรียในน้ำนม (milk urea nitrogen, MUN) ตามวิธีการของ Roseler et al. (1993)

3.3.2.7 สุ่มเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมน ในตอนเช้าของวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน 3 ครั้ง คือ ในช่วงเวลาที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ภายหลังจากให้อาหารในตอนเช้า โดยการใช้ stomach tube สอดผ่านหลอดอาหาร แล้วดูดของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ vacuum pump ประมาณ 300 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ด้วยเครื่อง pH / temperature meter ทันที จดบันทึกข้อมูลที่ได้ จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเก็บไว้ประมาณ 90 มิลลิลิตร แล้วหยดด้วย 1 โมลของกรดซัลฟุริก (1 M H₂SO₄) 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมักของจุลินทรีย์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินเอาน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยวิธีการกลั่น ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965) และวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid, C₂) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C₃) และกรดบิวทิริก (butyric acid, C₄) โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp)

ปรับปรุงจากวิธีการของ Samuel et al. (1997) และของเหลวจากกระเพาะรูเมนส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์การผลิตแก๊สในห้องปฏิบัติการ

3.3.2.8 สุ่มเก็บตัวอย่างเลือด จากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ของโคนมแต่ละตัว ในวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง โดยเจาะที่ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ภายหลังให้อาหารในตอนเช้า ประมาณ 20 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีเฮปาริน (heparin) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปเหวี่ยงใส่ (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen, PUN) ตามวิธีของ Crocker (1967) และวิเคราะห์หากกลูโคสในกระแสเลือด (blood glucose, BG) ตามวิธีการของ Mills et al. (1981)

3.3.2.9 ศึกษาการผลิตแก๊สของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป ด้วยวิธี *in vitro* gas production technique ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) เพื่ออธิบายผลผลิตแก๊ส รูปแบบ และจลนพลศาสตร์การผลิตแก๊ส และเพื่อศึกษการย่อยได้ของวัตถุดิบ และอินทรีย์วัตถุในหลอดทดลอง (ภาคผนวกที่ 3)

3.3.2.10 เปรียบเทียบราคาสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปทั้ง 4 สูตร เพื่อคำนวณต้นทุนทางด้านอาหารต่อผลผลิตน้ำนม 1 กิโลกรัม สำหรับราคาน้ำนมใช้การประเมินจากรับซื้อโดยสหกรณ์โคนมขอนแก่น

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้ของค่าสังเกตที่ไม่มีการวัดซ้ำ นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design โดยใช้ Proc GLM (SAS, 1985) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test และเปรียบเทียบแบบ orthogonal polynomial ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) และข้อมูลที่ได้ของค่าสังเกตที่มีการวัดซ้ำ ณ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบวัดซ้ำตามแผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (repeated measurements in Latin square design) เพื่อเปรียบเทียบแบบ orthogonal polynomial เนื่องจากเวลาที่ทำการศึกษาสุ่มเก็บตัวอย่างต่อค่าสังเกต และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ร่วมกับการเปรียบเทียบแบบ orthogonal polynomial จากระดับຄວາມແຕກຕ່າງในสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป โดยมีรูปแบบจำลองในการวิเคราะห์ดังนี้

แบบจำลอง: สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจัดสุ่มละตินที่ไม่มีการวัดซ้ำ

$$Y_{ijk} = \mu + \rho_i + \gamma_j + \tau_k + \varepsilon_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijk} = ค่าสังเกตจากแถวที่ i, คอลัมน์ที่ j, ทรีทเมนต์ที่ k

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกต

ρ_i = อิทธิพลเนื่องจากเวลา (period) เมื่อ i = 1, 2, 3 และ 4

γ_j = อิทธิพลเนื่องจากตัวสัตว์ (animal) เมื่อ j = 1, 2, 3 และ 4

τ_k = อิทธิพลเนื่องจากทรีทเมนต์ (treatment) เมื่อ k = 1, 2, 3 และ 4

ε_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

แบบจำลอง: สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจัดสุ่มละตินที่มีการวัดซ้ำ

$$Y_{ijkl} = \mu + \rho_i + \gamma_l + \alpha_j + \delta_{jk} + \tau_k + \alpha\tau_k + \phi_{ijkl}$$

เมื่อ Y_{ijkl} = ค่าสังเกตจากปัจจัยทดลองที่ระดับ j และเวลาที่ k แถวที่ i, คอลัมน์ที่ l เมื่อ k = 1,...,r

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกต

ρ_i = อิทธิพลเนื่องจากแถว เมื่อ i = 1, 2, 3 และ 4

γ_l = อิทธิพลเนื่องจากคอลัมน์ เมื่อ l = 1, 2, 3 และ 4

α_j = อิทธิพลเนื่องจากทรีทเมนต์ที่ระดับ j เมื่อ j = 1, 2, 3 และ 4

δ_{jk} = อิทธิพลเนื่องจากตัวสัตว์ที่ระดับ k เมื่อ k = 1,..., r

τ_k = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยเวลาที่ระดับ k เมื่อ k = 1,..., r

$\alpha\tau_k$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ j และเวลาที่ระดับ k

ϕ_{ijkl} = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

3.4 ระยะเวลาทำงานทดลอง

เริ่มทำงานทดลองวันที่ 25 พฤษภาคม ถึง 7 กันยายน พ.ศ. 2548 รวมระยะเวลา 106 วัน

3.5 สถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

3.5.1 หมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.3 ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน (Tropical Feed Resources Research and Development Center, TROFREC) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น