บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้โคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein Friesian crossbred) ระดับสายเลือด 75.25-87.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ตัว ที่มีช่วงการให้นมเฉลี่ย 100±30 วัน และมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 421.3±44.3 กิโลกรัม และให้น้ำนมในช่วง 10-15 กิโลกรัมต่อวัน

3.2 อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ทดลองมีทั้งหมด 4 สูตร โดยจัดทำในรูปแบบสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่มีสัดส่วนระหว่างอาหารข้น 40 ต่อ 60 และ 50 ต่อ 50 โดยแหล่งอาหารหยาบที่ใช้เป็นเยื่อใยชนิดที่ไม่ใช่พืชอาหารสัตว์ คือ ซังข้าวโพด และในสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปมีสัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น 50 กับ 50 มีการทดแทนซังข้าวโพดด้วยฟางข้าวที่ระดับ 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีรายละเอียดของอาหารทดลอง ดังนี้

อาหารทดลองที่ 1 (TMR1) : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (40:00:60)

อาหารทดลองที่ 2 (TMR2) : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (50:00:50)

อาหารทดลองที่ 3 (TMR3) : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (40:10:50)

อาหารทดลองที่ 4 (TMR4) : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (30:20:50)

มีการคำนวณให้มีโภชนะที่สำคัญเท่ากัน คือ โปรตีนหยาบ 17 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับพลังงาน 2.5 Mcal ME/kgDM (Table 3.1) เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการในการให้ผลผลิตน้ำนมของโคนมปานกลาง (10-15 กิโลกรัม/วัน ไขมันนม 4 เปอร์เซ็นต์) ที่รายงานไว้โดย NRC (1989)

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ (% วัตถุแห้ง)	สูตรอาหารผสมสำเร็จรูป (TMR)			
	1	2	3	4
ซังข้าวโพดบด	40.0	50.0	40.0	30.0
ฟางข้าวบด	0	0	10.0	20.0
มันเส้น	20.0	20.0	20.0	20.0
ข้าวโพดบด	4.5	1.0	2.5	2.5
ถั่วเหลืองบด	16.0	18.0	18.0	18.0
กากปาล์ม	11.0	2.5	1.0	1.0
กากน้ำตาล	5.0	5.0	5.0	5.0
น้ำมันพืช	1.0	1.0	1.0	1.0
ยูเรีย	1.0	1.0	1.0	1.0
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	0.5	0.5	0.5	0.5
เกลือ	0.4	0.4	0.4	0.4
กำมะถัน	0.1	0.1	0.1	0.1
พรีมิกส์	0.5	0.5	0.5	0.5
รวม, กก.	100.0	100.0	100.0	100.0
ราคา, บาท/กก.	4.20	4.08	3.97	3.94

3.3 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (4 X 4 latin square) ในแต่ละช่วงเวลาการทดลองใช้เวลา 21 วัน ระยะพักระหว่างช่วงเวลาการทดลอง 5 วัน ดังแผนผังการทดลอง

ช่วงการทดลอง/ สัตว์ทดลอง	1	2	3	4
1	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4
2	TMR2	TMR3	TMR4	TMR1
3	TMR4	TMR1	TMR2	TMR3
4	TMR3	TMR4	TMR1	TMR2

TMR1 : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (40:00:60)

TMR2 : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (50:00:50)

TMR3 : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (40:10:50)

TMR4 : ซังข้าวโพด : ฟางข้าว : อาหารข้น (30:20:50)

3.4 การจัดเตรียมและการให้อาหารโคนม

ชังข้าวโพด และฟางข้าวนำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 เซนติเมตร แล้วนำมาผสมรวมกับวัตถุดิบอาหารข้นในสัดส่วนดังแสดงใน Table 3.1 โดยใช้เครื่องผสมแบบแนวนอน ทำการผสมครั้งละ 100 กิโลกรัม โคนมแต่ละตัวได้รับอาหารผสมสำเร็จรูปแบบเต็มที่ (ad libitum) โดยแบ่งให้อาหาร 3 เวลา คือ 06.00, 11.00 และ 16.00 น. ปรับปริมาณการกินอาหารทุก ๆ วัน โดยเพิ่มหรือลดปริมาณอาหารขึ้นหากอาหารเหลือในรางอาหารน้อยกว่าหรือมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารที่ให้

โคนมทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิภายนอกภายใน และไวตามิน เอดี$_3$อี ก่อนเข้าการทดลอง 1 สัปดาห์ จากนั้นสุ่มโคนมแต่ละตัวเข้าคอกขังเดี่ยว และสุ่มอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ ให้โคนมแต่ละตัว โดยมีน้ำสะอาด และแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา

3.5 การเก็บข้อมูล

3.5.1 บันทึกปริมาณอาหารที่ให้และที่เหลือในตอนเช้าและเย็นทุกวัน คำนวณปริมาณการกินได้วัตถุแห้งของแต่ละวัน ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

ปริมาณการกินได้ต่อวัน (วัตถุแห้ง)

= [อาหารให้ตอนเช้า (วัตถุแห้ง)–อาหารเหลือตอนเช้า (วัตถุแห้ง)] - [อาหารให้ตอนเย็น (วัตถุแห้ง)–อาหารเหลือตอนเย็น (วัตถุแห้ง)]

3.5.2 สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารผสมสำเร็จรูปแต่ละสูตรเป็นระยะเวลา 7 วันติดต่อกัน (วันที่ 15-21 ของแต่ละช่วงการทดลอง) โดยแบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคำนวณหาวัตถุแห้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยของวัตถุแห้งที่กินได้และวัตถุแห้งที่เหลือ ส่วนที่ 2 อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ใช้ในการวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี คือ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (Ash), โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีการมาตรฐาน (AOAC, 1985) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารพอกที่ไม่เป็นกลาง (neutral detergent fiber, NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารพอกที่ไม่เป็นกรด (acid detergent fiber, ADF) และลิกนิน (acid insoluble lignin, ADL) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) และเถ้าที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (acid insoluble ash, AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977)

3.5.3 สุ่มเก็บตัวอย่างมูลเป็นระยะเวลา 7 วันติดต่อกัน (วันที่ 15-21 ของแต่ละช่วงการทดลอง) แล้วนำมารวมกัน สุ่มเก็บ 10 เปอร์เซ็นต์ของมูลที่ทำการสุ่มเก็บครั้งแรก จากนั้นนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร นำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี คือ วัตถุแห้ง เถ้า โปรตีนหยาบ และไขมัน (AOAC, 1985)

เยื่อใย NDF เยื่อใย ADF และ ADL ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) และ AIA ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) เพื่อคำนวณค่า สัมประสิทธิ์การย่อยได้จากสมการ

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (\%)} = 100-\left[\frac{100(\%\text{AIA ในอาหาร})}{\%\text{AIA ในมูล}}\right]$$

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

3.5.4 การวิเคราะห์หาการย่อยได้วัตถุแห้งแบบ in vitro โดยใช้ pepsin-cellulase (Pepsin-cellulase in vitro dry matter digestibility) ตามวิธีการของ McLeod and Minson (1978) (รายละเอียดดูในภาคผนวก)

3.5.5 นอกจากนี้ทำการประเมินค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ จากผลผลิตแก๊สของอาหารผสมสำเร็จรูปด้วยวิธี *in vitro* gas production technique ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988)

3.5.6 บันทึกปริมาณผลผลิตน้ำนมของโคนมแต่ละตัวทุกวันเช้า-เย็น และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนม 2 ครั้ง ครั้งแรกเก็บเย็นวันที่ 13 เช้าวันที่ 14 และเย็นวันที่ 20 เช้าวันที่ 21 ของช่วงการทดลอง ปริมาณ 25 มิลลิลิตร นำมารวมกันแล้วเติมโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) 250 มิลลิกรัม เก็บในขวดสีชา เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงไปขององค์ประกอบน้ำนม จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (ณิฐิมา และคณะ, 2546) นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ คือ โปรตีน ไขมัน ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมไขมัน และน้ำตาลแลคโตส โดยเครื่อง milko-scan Model 133 V.3. 7GB. และนำอีกส่วนหนึ่งไปเหวี่ยงใสที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อวิเคราะห์ยูเรียในน้ำนม (milk urea nitrogen, MUN) ตามวิธีการของ Broster et al. (1993)

3.5.7 สุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนในตอนเช้าของวันที่ 21 ของแต่ละช่วงการทดลอง ทำการสุ่ม 3 ครั้ง คือ ในชั่วโมงที่ 0 (ก่อนการให้อาหาร) 2 และ 4 ชั่วโมง หลังจากให้อาหารในตอนเช้า โดยการใช้สอดท่อผ่านทางหลอดอาหาร (stomach tube) เพื่อดูดของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ประมาณ 200-300 มิลลิลิตร แล้ววัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH/temperature meter ทันที จากนั้นกรองของเหลวจากกระเพาะรูเมนผ่านผ้าขาวบางเก็บไว้ประมาณ 90 มิลลิลิตร และหยดด้วย 1 M H_2SO_4 จำนวน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมักของจุลินทรีย์ นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินเอาน้ำใสที่อยู่ส่วนด้านบน (supernatant) เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศา

เซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์การแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยวิธีการกลั่นตามวิธีการของ Bremner and Keeney (1965) และนำของเหลวอีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ กรดอะซิติค (acetic acid, C_2), กรดโพรพิโอนิค (propionic acid, C_3), และ กรดบิวทีริค (butyric acid, C_4) โดยใช้ Gas Chromatography (GC)

3.5.8 สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 21 ของทุกช่วงการทดลอง โดยเจาะที่เส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) ณ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง หลังให้อาหารในตอนเช้า เก็บในหลอดที่มี เฮปพาริน (heparin) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสมา (plasma) นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen, PUN) โดยวิธีการของ Crocker (1967)

3.5.9 ชั่งน้ำหนักโคนมตอนเช้าเวลา 6.30 น. ในวันที่ 21 ของทุกช่วงการทดลอง เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และเพื่อนำค่าน้ำหนักตัวที่ได้มาคำนวณหาปริมาณการกินได้ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว (%BW) และต่อน้ำหนักเมแทบอลิก ($g/kgW^{0.75}$)

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลตกค้างระหว่างช่วงระยะเวลาทดลอง โดยวิธีการวิเคราะห์การทดลองแบบจัตุรัสละตินเพื่อวัดผลตกค้าง (latin square design to estimate residual effects) ข้อมูล pH ยูเรียในพลาสมา และ ค่าแอมโมเนีย-ไนโตรเจน สำหรับข้อมูลที่มีการวัดซ้ำ ณ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) แบบวัดซ้ำตามแผนการทดดลองแบบจัตุรัสละติน (repeated measurements in latin square design) เพื่อวิเคราะห์แนวโน้ม (orthogonal polynomial) เนื่องจากเวลาที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต่อค่าสังเกต และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ร่วมกับวิเคราะห์แนวโน้มจากระดับชังข้าวโพดในสูตรอาหาร (orthogonal polynomial) และวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าสังเกตที่ไม่มีการวัดซ้ำ ตามแผนการทดลองแบบ 4 x 4 Latin Square Design โดยใช้ general linear model (GLM) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test และวิเคราะห์แนวโน้ม (orthogonal polynomial) ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1985) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985) โดยมีแบบหุ่นในการวิเคราะห์ดังนี้

แบบหุ่น สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจตุรัสละตินที่ไม่มีการวัดซ้ำ

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

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

μ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

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

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

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

εijk = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

แบบหุ่น สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจตุรัสละตินที่มีการวัดซ้ำ

$$Y_{ijkl} = \mu + \rho i + \gamma l + \alpha_j + \delta_{ik} + \tau k + \alpha\tau k + \phi ijk$$

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

μ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

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

γl = อิทธิพลเนื่องจากสดมภ์ เมื่อ l = 1, 2, 3 และ 4

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

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

τk = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยเวลา ที่ระดับ k เมื่อ k = 1,.., r

$\alpha\tau_{jk}$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ j และเวลาที่ระดับ k

ϕijk = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

3.7 ระยะเวลาทำงานทดลอง

เริ่มทำงานทดลองวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2548 ถึง 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2548 รวมระยะเวลา 92 วัน

3.8 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.8.1 หมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.3 ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.4 Laboratory of Tropical Pasture, Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture, University of the Rykyus, Okinawa, Japan