# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการทดลอง

## 3.1 สัตว์ทดลอง

3.1.1 โคนมเพศผู้ตอน (Holstein-Fresian crossbred dairy steers) ที่ทำการเจาะกระเพาะรูเมนจำนวน 4 ตัวน้ำหนักตัวเฉลี่ย 350 $\pm$ 10 กิโลกรัม อายุ 2 ปี 5 เดือน

3.1.2 สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอกก่อนเข้าการทดลอง

3.1.3 สัตว์ทุกตัวได้รับการฉีดวิตามินเอ ดี3 และ อี ($AD_3E$) ก่อนเข้าการทดลอง

## 3.2 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design โดยให้ช่วงเวลาการทดลอง (period) เป็นแถว (row) และสัตว์ทดลองคือโคนมเพศผู้ตอนเป็นคอลัมน์ (column) ซึ่งมีทรีทเมนต์ (treatment) ที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 4 ทรีทเมนต์ คือสูตรอาหารข้นที่มีองค์ประกอบของน้ำมัน 5% โดยใช้น้ำมันสองชนิดในสัดส่วนต่างๆ กัน ได้แก่

ทรีทเมนต์ที่ 1 น้ำมันมะพร้าว 100% (T1)

ทรีทเมนต์ที่ 2 น้ำมันมะพร้าว 75% น้ำมันทานตะวัน 25% (T2)

ทรีทเมนต์ที่ 3 น้ำมันมะพร้าว 50% น้ำมันทานตะวัน 50% (T3)

ทรีทเมนต์ที่ 4 น้ำมันมะพร้าว 25% น้ำมันทานตะวัน 75% (T4)

โดยมีแผนผังการทดลองดังนี้

**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 การเตรียมอาหารทดลอง

3.3.1 อาหารหยาบ เตรียมฟางหมักยูเรีย โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการนวดด้วยเครื่องนวดข้าวและอัดเป็นฟ่อน นำมาเรียงเป็นชั้นลงในบ่อซีเมนต์ที่ปูรองพื้นด้วยพลาสติกสีดำละลายยูเรีย (46 %N) ในน้ำในอัตราส่วน ยูเรีย 5 กิโลกรัมน้ำ 100 กิโลกรัม หลังจากนั้นราดลงบนฟาง 100 กิโลกรัมให้ทั่ว ทำอย่างนี้เป็นชั้นๆ ตามปริมาณที่ต้องการหมัก หลังจากนั้นใช้พลาสติกสีดำคลุม

บนกองฟางอย่างมิดชิด ใช้เวลาในการหมักอย่างน้อย 10 วัน จึงทำการเปิดเพื่อนำมาให้สัตว์กิน และปิดให้สนิททุกครั้งเพื่อรักษาคุณภาพของฟางหมักยูเรีย (เมธา 2533)

3.3.2 อาหารข้น เตรียมอาหารข้นตามทรีทเมนต์ โดยคำนวณให้สัตว์ทดลองในแต่ละทรีทเมนต์กินหมดภายใน 15 วัน ผสมโดยใช้มือตามวิธีมาตรฐาน

### 3.4 อาหารและการให้อาหาร

ให้โคได้รับอาหารข้นตามทรีทเมนต์วันละ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้งในเวลา 07.00 น. และ 16.00 น. ในปริมาณเท่ากัน และได้รับอาหารหยาบคือฟางหมักยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์ (urea-treated rice straw, UTRS) โดยได้รับแบบเต็มที่ในระหว่างวันที่ 1-21 เพื่อศึกษาปริมาณการกินได้อิสระ และในช่วงวันที่ 22-28 สัตว์อยู่บนกรงเมทธาโบลิซึม โดย 2 วันแรกทำการปรับสภาพสัตว์ให้คุ้นเคยกับสถานที่หลังจากนั้นทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 วันก่อนถึงวันสุดท้ายอย่างต่อเนื่อง ตลอดการทดลองมีน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้โคกินอย่างอิสระ

**ตารางที่ 3.2** องค์ประกอบของอาหารข้นจากการคำนวณและฟางข้าวหมักยูเรีย 5%

| วัตถุดิบ, % วัตถุแห้ง | T1 | T2 | T3 | T4 |
|---|---|---|---|---|
| มันเส้น | 63.0 | 63.0 | 63.0 | 63.0 |
| รำละเอียด | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| กากปาล์ม | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| มันเฮย์ | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| ยูเรีย | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| น้ำมันมะพร้าว | 5.0 | 3.75 | 2.5 | 1.25 |
| น้ำมันเมล็ดทานตะวัน | 0.0 | 1.25 | 2.5 | 3.75 |
| เกลือ | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| แร่ธาตุวิตามินผสมล่วงหน้า | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| กำมะถัน | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| กากน้ำตาล | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| รวม | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| ราคา, บาท/กิโลกรัม[1] | 5.35 | 5.76 | 6.17 | 6.57 |

[1] เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548

**3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง**

3.5.1 ก่อนเข้าการทดลอง ทำการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอก และทำการฉีดวิตามินเอ ดี3 และ อี ให้สัตว์ทุกตัว

3.5.2 ระยะปรับสัตว์ก่อนเข้าทดลอง ให้สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางหมักยูเรีย 5% แบบเต็มที่ และให้อาหารข้นตามทรีทเมนต์ที่สัตว์ได้รับในคอกทดลองเป็นเวลา 10 วัน เพื่อเป็นการปรับสัตว์ให้คุ้นเคยกับอาหารและคอกทดลอง

3.5.3 สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบ 4X4 Latin square design โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับอาหารข้นตามทรีตเมนต์ที่กำหนดในแต่ละช่วงของการทดลอง และได้รับฟางหมักยูเรีย 5% แบบเต็มที่

**3.6 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล**

3.6.1 บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์โดยทำการชั่งน้ำหนักก่อนเข้าช่วงการทดลอง (period) และในวันที่ 21 ก่อนสัตว์ทดลองอยู่บนกรงเมทธาโบลิซึม และในวันที่ 28 หลังจากอยู่บนกรงเมทธาโบลิซึมของทุกระยะการทดลอง เพื่อใช้ในการคำนวณการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก (weight change) ของสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงการทดลอง เพื่อใช้ในการคำนวณการให้อาหารและคำนวณปริมาณการกินได้

3.6.2 บันทึกปริมาณการให้อาหารข้น และอาหารหยาบ เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณการกินได้ในแต่ละวันโดยทำการจดบันทึกปริมาณอาหารที่กินให้และอาหารที่เหลือทั้งเช้าและเย็นทุกวัน

3.6.3 สุ่มเก็บตัวอย่างอาหาร อาหารที่เหลือ น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันเมล็ดทานตะวัน โดยเก็บในปริมาณอย่างละ 500 กรัม ในแต่ละ ทรีทเมนต์ ทุก ๆ วันที่ 1, 14 และ 28 ของแต่ละช่วงการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (DM), เถ้า (ash) ไขมัน (EE) และโปรตีนหยาบ (crude protein) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1985) วิเคราะห์หา เยื่อใย NDF (neutral detergent fiber, NDF) และ เยื่อใย ADF (acid detergent fiber, ADF) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970)

3.6.4 สุ่มเก็บตัวอย่างมูลใน 5 วันก่อนถึงสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลอง โดยทำการสุ่มเก็บที่เวลา 6.30 น. ชั่งน้ำหนักมูลทั้งหมด การเก็บมีถาดรองมูลซึ่งอยู่ด้านหลังของถาดรองปัสสาวะ ก่อนเก็บทำการคลุกทุกส่วนให้เข้ากัน และแบ่งเก็บออกเป็น 2 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 เก็บประมาณ 1 กิโลกรัม นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์หาวัตถุแห้งของมูลที่ขับถ่ายออกมาในแต่ละวัน

ส่วนที่ 2 เก็บไว้ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมูลทั้งหมดในแต่ละวัน นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเช่นนี้จนครบ 5 วัน แล้วนำมูลทั้งหมดของแต่ละกลุ่มทดลองมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการสุ่มเก็บอีกครั้งและนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้งสนิท แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 0.1 มิลลิเมตร เพื่อนำไป

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร เพื่อนำไปคำนวณหาการย่อยได้ตามวิธีของ Schnieder and Flatt (1975)

3.6.5 เก็บตัวอย่างปัสสาวะใน 5 วันสุดท้าย ของในแต่ละช่วงของการทดลอง โดยการใส่ถาดรองเก็บปัสสาวะซึ่งในถาดนั้นเติม 1 M $H_2SO_4$ ในสัดส่วน 1 M $H_2SO_4$ ต่อปัสสาวะในสัดส่วน 1 : 10 เพื่อเป็นการตรึงไนโตรเจนในปัสสาวะก่อนที่จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิประมาณ -5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivative) เพื่อใช้ในการประเมินการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีน โดยการใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp.) ดัดแปลงตามวิธีของ Resines et al., (1992)

3.6.6 เก็บตัวอย่างเลือด ที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังการให้อาหาร ในวันที่ 28 ของแต่ละช่วงการทดลอง โดยเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) ใส่สารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเก็บส่วน plasma แบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียไนโตรเจน Crocker (1967)

ส่วนที่ 2 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของไขมันในพลาสม่าโดยใช้เครื่อง HPLC โดยดัดแปลงวิธีของ Czauderma and Kowalczyk (2001) โดยมีวิธีการดังนี้

นำตัวอย่างพลาสม่า 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสีชาขนาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยการเติม 2 M NaOH 3-4 มิลลิลิตร ปิดขวดให้สนิทและปิดทับอีกชั้นด้วยพาราฟินฟิล์ม นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 85-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35-40 นาที เขย่าทุก ๆ 10 นาที นำออกจากตู้อบทิ้งให้เย็นลงในห้องมืด จากนั้นปรับให้เป็นกรด pH ประมาณ 2 ด้วย 4 M HCl สกัดกรดไขมันด้วย dichloromethane 3.5 มิลลิลิตร 4 ครั้ง โดยแยกชั้นของ dichloromethane ออกด้วยกรวยแยก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ใส่ในขวดสีชาขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปทิ้งไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาทิ้งไว้จน dichloromethane ระเหยออกหมด นำสิ่งที่เหลือในขวดมาทำกระบวนการ derivatization โดยเติม dibromacetophenone (12 กรัม/ลิตร ใน อะซิโตน) 0.5 มิลลิลิตร และ triethylamine (10 กรัม/ลิตร ใน อะซิโตน) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ และทิ้งให้ทำปฏิกิริยาใน water batch พร้อมด้วย shaker อุณหภูมิ 50 องศาสเซลเซียส 2 ชั่วโมง โดยไม่ให้โดนแสง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วยดารเติมกรดอะซิติก (2 กรัม/ลิตร ใน อะซิโตน) 50 ไมโครลิตร เก็บในที่ไม่มีแสงอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (Water 600 controller, Water 486 Tunable Absorbance Detector, NOVA-PAK C18 3.9x300 mm Column) โดยมี Mobile phase คือสารละลาย acetonitrile-water (85:15, v/v) อัตราการฉีด 2.0 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ column ประมาณ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ความดันสูงสุดภายในเครื่อง 2500 psi ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และเวลาพักระหว่างตัวอย่างคือ 10 นาที

3.6.7 ในวันที่ 28 ของแต่ละช่วงการทดลองจะสุ่มวัดความเป็นกรด-ด่างของของเหลวในกระเพาะรูเมนโดยใช้ pH meter (HANNA instruments HI 8424 microcomputer) โดยจุ่มในกระเพาะรูเมน 5 จุดและอ่านค่านำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยในช่วงโมงที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังการให้อาหารเช้า และสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังการให้อาหารช่วงเช้า โดยเก็บผ่านทางกระบอก fistulae tube โดยแบ่ง rumen fluid เป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 ปริมาตร 90 มิลลิลิตรปรับให้มีค่า pH ประมาณ 3 ด้วยการเติม 1 M $H_2SO_4$ ในสัดส่วน 1M $H_2SO_4$ ต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมนในสัดส่วน 1 : 9 เพื่อหยุดการเจริญของ จุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใสแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($NH_3$-N) โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 2100 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)

ส่วนที่ 2 ใช้ในการศึกษาชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ดังนี้

นำ rumen content ที่ทราบน้ำหนักประมาณ 10 มิลลิลิตร (เฉพาะที่ชั่วโมงที่ 0 และ 4) บรรจุในถุงพลาสติกใส นำมาเติม anaerobic dilution ที่ผสม tween 80 ให้ได้สัดส่วน rumen content : anaerobic dilution เท่ากับ 1:4 (w/v) จากนั้นนำมาแทนที่ก๊าซ $O_2$ โดยผ่านด้วยก๊าซ $CO_2$ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจับถุงเขย่าอย่างแรงเพื่อให้จุลินทรีย์ที่เกาะกับเศษอาหารหลุดออกมากระจายใน solution จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 2.1 ทำการเจือจาง rumen content ให้ความเจือจางลดลงระดับละ 10 เท่า ตามลำดับตั้งแต่ $10^{-1}$, $10^{-2}$ ถึง $10^{-9}$ นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ roll tube technique ตามวิธีของ Hungate (1969) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียได้แก่ amylolytic bacteria, cellulolytic bacteria, proteolytic bacteria และ total viable count ตามรายละเอียดใน Hobson (1969) เพื่อนับ colonies ของแบคทีเรียที่เจริญ ซึ่งระดับความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมีดังนี้ total viable count คือ $10^{-7}$, $10^{-8}$ และ $10^{-9}$ กลุ่ม proteolytic bacteria คือ $10^{-5}$, $10^{-6}$ และ $10^{-7}$ กลุ่ม cellulolytic และ amylolytic bacteria คือ $10^{-6}$, $10^{-7}$ และ $10^{-8}$ โดยปริมาตรตัวอย่างที่ใช้แต่ละระดับความเจือจางได้แก่ 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร สำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจะใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มดูดก๊าซ $CO_2$ ขึ้นลงเพื่อไล่อากาศในเข็ม จากนั้นจึงเสียบลงบนขวด rumen content เพื่อดูดตามระดับความเจือจางและปริมาตรที่กำหนด ใส่ลงในขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะแต่ละกลุ่ม จากนั้นนำขวดอาหารผสม rumen content ไปทำ roll tube โดยนำไปกลิ้งบนถาดน้ำแข็งเพื่อให้อาหารวุ้นแข็งตัวรอบขวด ใช้ผ้าซับน้ำรอบขวดให้แห้ง นำไปวางบน rack โดยคว่ำปากขวดลงด้านล่าง ทำวิธีการเช่นนี้ในทุก

กลุ่มแบคทีเรีย จากนั้นนำขวดที่ทำ roll tube แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างกันในแต่ละกลุ่มดังนี้ total viable count และ proteolytic bacteria เป็นเวลา 5 วัน amylolytic bacteria เป็นเวลา 3 วัน และ cellulolytic bacteria เป็นเวลา 21 วัน เพื่อทำการตรวจนับจำนวน colonies ของแบคทีเรียที่เจริญ

ส่วนที่ 2.2 นำ rumen content ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่บรรจุ 10% formalin in normal saline with methyl green ในปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าขวดเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปนับโดยใช้ counting chamber ต่อไป

ส่วนที่ 3 นำของเหลวจากกระเพาะรูเมนมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเครื่อง HPLC ดัดแปลงตามวิธีของ Czauderna and Kowalczyk (2001) โดยมีวิธีการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์กรดไขมันในพลาสมา

3.6.8 สุ่มเก็บก๊าซจากส่วน caudal dorsal blind sac ของกระเพาะรูเมน โดยสุ่มในชั่วโมงที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังการให้อาหารช่วงเช้าในวันที่ 27 ของแต่ละช่วงการทดลอง ปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร สุ่มเก็บโดยใช้ syringe ที่ต่อกับสายยาง สอดเข้าทาง rumen fistulae ทำการดูดก๊าซช้า ๆ เพื่อไม่ให้ติดส่วนที่เป็นของแข็งหรือของเหลว ปิดปลาย syringe ด้วย paraffin film เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ความเข้มข้นของก๊าซเมธเทนด้วย gas chromatography ตามวิธีของ Soliva et al. (2004)

### 3.7 วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดย General Linear Model (GLM) ตามแผนการทดลอง 4 X 4 Latin square design วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของก๊าซเมทเธนและกรดไขมันในกระเพาะรูเมน และความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดไขมันในกระเพาะรูเมนและพลาสมาด้วย proc correlation โดยใช้โปรแกรม SAS (1985) วิเคราะห์การตอบสนองของค่าสังเกตต่อทรีทเมนต์โดยใช้ Orthogonal polynomial และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีของ Steel and Torrie (1985) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

$Y_{ijk} = \mu + R_i + C_j + T_k + \varepsilon_{ijk}$

เมื่อ $Y_{ijk}$ = ค่าสังเกตจากช่วงเวลาทดลองที่ i สัตว์ทดลองที่ j ทรีทเมนต์ที่ k

$\mu$ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมด

$R_i$ = อิทธิพลเนื่องจากช่วงเวลาทดลองที่ i เมื่อ i = 1 ถึง 4

$C_j$ = อิทธิพลเนื่องจากสัตว์ทดลองที่ j เมื่อ j = 1 ถึง 4

$T_k$ = อิทธิพลเนื่องจากทรีทเมนต์ที่ k เมื่อ k = 1 ถึง 4

$\varepsilon_{ijk}$ = Error

**3.8 สถานที่ทำการวิจัย**

3.8.1 หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.2 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.3 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น