

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์และอาหารทดลอง

การศึกษาการใช้เปลือกฝักถั่วเหลืองร่วมกับฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบในสูตรอาหารโคนม ใช้โคทดลองลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน (crossbred Holstein Friesian) มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 420.3 ± 30.4 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว โคทดลองแต่ละตัวให้น้ำนมรอบที่ 3 ของวงรอบการให้น้ำนม และอยู่ในช่วงการให้นมเฉลี่ย 80 ± 5 วัน โคทดลองทุกตัวมีสุขภาพสมบูรณ์ได้ทำการถ่ายพยาธิโดยใช้ไอวาเมกต์ และวิตามิน เอดี₃ ก่อนเข้าการทดลอง 1 สัปดาห์ จากนั้นสุมโคทดลองแต่ละตัวให้อยู่ในคอกขังเดี่ยว และให้อาหารแยกแต่ละตัว ซึ่งอาหารทดลอง (dietary treatment) มีดังนี้

การให้อาหารแบบแยกให้ที่มีเปลือกฝักถั่วเหลือง : ฟางข้าว : อาหารข้น 20:20:60 (SF)

สูตรอาหารผสมสำเร็จที่มีเปลือกฝักถั่วเหลือง : ฟางข้าว : อาหารข้น 30:10:60 (TMR1)

สูตรอาหารผสมสำเร็จที่มีเปลือกฝักถั่วเหลือง : ฟางข้าว : อาหารข้น 20:20:60 (TMR2)

สูตรอาหารผสมสำเร็จที่มีเปลือกฝักถั่วเหลือง : ฟางข้าว : อาหารข้น 10:30:60 (TMR3)

โคทดลองแต่ละตัวถูกแยกขังในคอกเดี่ยวขนาด 3x6 เมตร มีที่ให้อาหารแยกแต่ละตัว มีน้ำสะอาด และแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง คำนวณให้มีโภชนะตามความต้องการของโคนมที่ให้น้ำนมเฉลี่ย 10-15 กิโลกรัมต่อวัน ไขมันนม 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีระดับโปรตีนหยาบ 14 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ 2.5 Mcal/kgDM (NRC, 1988) สำหรับการจัดเตรียมสูตรอาหารผสมสำเร็จ ทำโดยการบดเปลือกฝักถั่วเหลืองและฟางข้าว ผ่านตะแกรงขนาด 1 เซนติเมตร แล้วนำไปผสมกับวัตถุดิบอาหารข้น ตามสัดส่วนที่ได้กำหนดไว้ (ตารางที่ 3.1) สำหรับอาหารแบบแยกให้ ทำการให้อาหารโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว ในสัดส่วนเปลือกฝักถั่วเหลือง:ฟางข้าว:อาหารข้น 20:20:60 เปอร์เซ็นต์

3.2 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (4x4 Latin square design) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ช่วงเวลาการทดลอง (period) ในแต่ละช่วงเวลาการทดลองใช้เวลา 21 วัน มีระยะพักระหว่างช่วงเวลาการทดลอง 3 วัน ในแต่ละระยะการทดลองมีอาหารครบทั้ง 4 สูตร เมื่อทดลองครบหนึ่งช่วงเวลาการทดลอง โคทดลองแต่ละตัวจะเปลี่ยนไปรับอาหารทดลองสูตรอื่นโดยไม่ซ้ำกัน จนครบทั้ง 4 สูตร ดังแผนผังการทดลอง ต่อไปนี้

ระยะเวลา/ สัตว์ทดลอง	สัตว์ทดลอง2	สัตว์ทดลอง1	สัตว์ทดลอง4	สัตว์ทดลอง3
ระยะเวลา1	TMR1	TMR2	TMR3	SF
ระยะเวลา2	SF	TMR3	TMR1	TMR2
ระยะเวลา3	TMR3	SF	TMR2	TMR1
ระยะเวลา4	TMR2	TMR1	SF	TMR3

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง

ส่วนประกอบ	อาหารชั้น ¹	TMR1	TMR2	TMR3
เปลือกฝักถั่วเหลือง	-	30	20	10
ฟางข้าว	-	10	20	30
มันเส้น	44	25	25	25
กากถั่วเหลือง	20.8	9.4	10.5	11.6
กากปาล์มเนื้อใน	17.6	12.6	11.5	10.4
ข้าวโพดบด	7	5.1	5.1	5.1
กากน้ำตาล	6	5	5	5
น้ำมันพืช	0.2	0.1	0.1	0.1
ไคแคลเซียมฟอสเฟต	0.5	0.3	0.3	0.3
ยูเรีย	2.4	1.6	1.6	1.6
เกลือ	0.5	0.3	0.3	0.3
แร่ธาตุ	0.5	0.3	0.3	0.3
กัมมะถัน	0.5	0.3	0.3	0.3
รวม	100	100	100	100
บาท/กิโลกรัม ²	6.7	4.2	4.4	4.6

¹ สูตรอาหารชั้นในการให้อาหารแบบแยกให้

² ราคาประจำเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2549 ณ สหกรณ์โคนม อ. นาวัง จ. หนองบัวลำภู

3.3 แผนการดำเนินงาน

3.3.1 การให้อาหารสัตว์ทดลอง

จัดให้โคทดลองได้รับสูตรอาหารผสมสำเร็จที่มีสัดส่วนของเปลือกฝักถั่วเหลืองและฟางข้าวที่ระดับต่างๆ โดยให้กินแบบเต็มที่ (ad libitum) แบ่งให้วันละ 3 เวลา คือ ในเวลาหลังรีด

เวลาหลังรีดนมตอนเช้า (6.30 น.) ตอนเที่ยง (11.30 น.) และหลังรีดนมตอนเย็น (16.00 น.) สำหรับการให้อาหารแบบแยกให้ ให้อาหารชั้นในช่วง เช้า เที่ยง และเย็น เหมือนกับการให้สูตรอาหารผสมสำเร็จ ส่วนอาหารหยาบให้กินตลอดเวลา ตามปริมาณที่กำหนดในแต่ละวัน ปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละครั้งชั่งน้ำหนักก่อน และอาหารที่เหลือชั่งออกทุกวัน ก่อนให้อาหารใหม่ในตอนเช้าวันถัดไป และทำการเพิ่มปริมาณอาหารชั้น หากอาหารเหลือในรางอาหารน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำสะอาด และแร่ธาตุก้อนให้กินอย่างเพียงพอตลอดเวลา

3.3.2 การเก็บข้อมูล

3.3.2.1 ชั่งน้ำหนักโคทดลอง สองครั้งคือครั้งแรกในช่วงเช้าหลังรีดนม (6.30 น.) ในวันที่ 14 และครั้งที่สองในวันที่ 21 ที่เวลาเดียวกัน ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง เพื่อคำนวณการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และเพื่อนำค่าน้ำหนักตัวที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณการกินได้ในหน่วยกิโลกรัมต่อวัน (kg/d), เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว (%BW) และกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว^{0.75} (g/kgW^{0.75})

3.3.2.2 บันทึกปริมาณการให้อาหาร ทุกวันตลอดช่วงเวลาการทดลอง ทั้งตอนเช้าและตอนเย็น ด้วยการชั่งน้ำหนักอาหารก่อนให้ และอาหารที่เหลือทุกครั้ง จดบันทึกปริมาณอาหารที่เหลือ และคำนวณปริมาณอาหารที่กินได้ในแต่ละวัน ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

ปริมาณการกินได้ต่อวัน (วัตถุแห้ง) =

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

3.3.2.3 บันทึกปริมาณผลผลิตน้ำนม ทุกวันตลอดช่วงเวลาการทดลอง ทั้งตอนเช้าและตอนเย็น เพื่อศึกษาผลผลิตน้ำนมเฉลี่ยต่อวันของโคทดลอง

3.3.2.4 สุ่มเก็บตัวอย่างสูตรอาหารทุกสูตร ติดต่อกัน 5 วัน ในช่วงวันที่ 17 ถึงวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง แบ่งอาหารเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter) นำค่าที่ได้ไปปรับปริมาณการกินได้โดยคิดต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง และอาหารอีกส่วนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของโภชนะต่างๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีของ AOAC (1985) วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลางหรือผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF), เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid detergent fiber, ADF) และลิกนิน (acid detergent lignin, ADL) ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970) และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977)

3.3.2.5 สุ่มเก็บมูลโคทดลองทุกตัว โดยสุ่มเก็บติดต่อกัน 5 วัน ในช่วงวันที่ 17 ถึงวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง ทำการสุ่มเก็บมูลในช่วงเช้า โดยวิธีส้วงผ่านทางทวารหนัก (rectum collection) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของดิน และแบ่งเก็บมูลไว้ประมาณ 300 กรัมต่อครั้ง ใส่ถุงแยกเป็นรายตัว ทำเครื่องหมายให้ชัดเจน นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส ให้แห้งจนครบ 5 วัน นำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร แล้วนำมูลทั้งหมดในปริมาณที่เท่ากันมาคลุกเคล้าให้เข้ากันทั้ง 5 วันของโคแต่ละตัว จากนั้นทำการสุ่มเก็บอีกครั้งประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อนำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบของโภชนะต่างๆ ได้แก่ DM, Ash, CP, NDF, ADF และ ADL เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร และวิเคราะห์หา AIA ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) และคำนวณหาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ตามวิธีของ Schnieder and Flatt (1975) โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

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

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

3.3.2.6 สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนม ในวันที่ 20 ตอนเย็น และตอนเช้าของวันที่ 21 นำมาผสมในสัดส่วนที่เท่ากันของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง โดยเก็บครั้งละ 50 มิลลิลิตร ในขวดสีชา จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (ณัฐมาและคณะ, 2546) เพื่อวิเคราะห์หาโปรตีน (protein), ไขมัน (fat), ของแข็งทั้งหมด (total solid), ของแข็งไม่รวมไขมัน (solids not fat) และน้ำตาลแลคโตส (lactose) โดยเครื่อง LactoStar (บริษัท FUNKE GERBER) และนำอีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรียในน้ำนม (milk urea nitrogen, MUN) ตามวิธีการของ Roseler et al. (1993)

3.3.2.7 สุ่มเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมน ในตอนเช้าของวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน 3 ครั้ง คือ ในชั่วโมงที่ 0, 2 และ 4 ภายหลังจากการให้อาหารในตอนเช้า โดยการใช้ stomach tube สอดผ่านหลอดอาหาร แล้วดูดของเหลวออกจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ vacuum pump ประมาณ 200-300 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ด้วยเครื่อง pH/temperature meter ทันที จดบันทึกข้อมูลที่ได้ จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น เก็บไว้ประมาณ 90 มิลลิลิตร แล้วหยดด้วย 1 โมลของกรดซัลฟูริก (1M H₂SO₄) 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมักของจุลินทรีย์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินเอาน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยวิธีการกลั่น ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965) และนำ

ของเหลวอีกส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (model Water 600 ; UV Detector; Millipore Corp.) ปรับปรุงจากวิธีการของ Samuel et al. (1997)

3.3.2.8 สุ่มเก็บตัวอย่างเลือด ในวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง โดยเจาะที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ภายหลังให้อาหารในตอนเช้า ประมาณ 20 มิลลิลิตร ในเข็มเจาะเลือด มีสารที่ทำให้เลือดตกตะกอนโดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรียในกระแสเลือด (blood urea nitrogen, BUN) ตามวิธีของ Crocker (1967)

3.3.2.9 ศึกษาการผลิตแก๊สของสูตรอาหารผสมสำเร็จ ด้วยวิธี in vitro gas production technique ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) (ภาคผนวก ก) เพื่อวัดปริมาณแก๊ส และศึกษาการย่อยได้ของวัตถุดิบ และอินทรีย์วัตถุในหลอดทดลอง

3.3.2.10 เปรียบเทียบราคาสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร เพื่อคำนวณต้นทุนค่าอาหารต่อผลผลิตน้ำนม 1 กิโลกรัม สำหรับราคาน้ำนมใช้การประเมินจากรับซื้อโดยสหกรณ์โคนม อ. นาวัง จ. หนองบัวลำภู

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากค่าสังเกตที่ไม่มีการวัดซ้ำ 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 และ orthogonal contrast ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980)

และข้อมูลที่ได้ของค่าสังเกตที่มีการวัดซ้ำ ณ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบวัดซ้ำ ตามแผนการทดลองแบบจัตุรัสละติน (repeated measurements in Latin square design) เพื่อเปรียบเทียบแบบ orthogonal polynomial และ orthogonal contrast เนื่องจากเวลาที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมีผลต่อค่าสังเกต และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ร่วมกับเปรียบเทียบแบบ orthogonal polynomial ตามระดับเปลือกฝักถั่วเหลืองและฟางข้าวในสูตรอาหารผสมสำเร็จ และทำการเปรียบเทียบแบบ orthogonal contrast ในส่วนของวิธีการให้อาหารแบบแยกให้และวิธีการให้สูตรอาหารผสมสำเร็จ โดยมีแบบจำลองในการวิเคราะห์ดังนี้

แบบจำลอง: สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจัตุรัสละตินที่ไม่มีการวัดซ้ำ

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

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 $k = 1, \dots, r$
 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 $k = 1, \dots, r$
 τ_k = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยเวลาที่ระดับ k เมื่อ $k = 1, \dots, r$
 $\alpha\tau_k$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ j และเวลาที่ระดับ k
 ϕ_{ijkl} = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

3.4 ระยะเวลาทำงานทดลอง

เริ่มทดลองวันที่ 11 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2549 รวมระยะเวลา 98 วัน

3.5 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.5.1 ทิวลิปฟาร์ม อ. นาหวัง จ. หนองบัวลำภู

3.5.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะ

เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

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