

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้โคลูกผสมอเมริกันบราห์มัน 75% อายุระหว่าง 18-24 เดือน จำนวน 24 ตัว โดยมีเพศผู้ตอน 12 ตัว เพศเมีย 12 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นทดลองเฉลี่ยทั้งสองเพศ  $281.8 \pm 2.8$  กิโลกรัม จัดการโคในช่วงปรับสัตว์ก่อนเข้างานทดลอง โดยทำเครื่องหมายติเบอร์ประจำตัวถ่ายพยาธิตัวกลมด้วยยาวัลบาเซน (valbazen) ถ่ายพยาธิใบไม้ในตับด้วยยาโทรเดกซ์ (trodox) ฉีดวิตามินเอ ดี อี ด้วยยาไวตาบิก (vitabik) และฉีดเป็นประจำทุกเดือนระหว่างการทดลอง ฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย (ไทป์โอ เอ เอเซียวัน) และโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (haemorrhagic septicemia)

#### 3.2 อาหารทดลอง

3.2.1 อาหารหยาบ ใช้ฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก ได้จากข้าวนาปี นวดด้วยมือมีลักษณะเป็นเส้นยาว นามาอัดเป็นฟ่อนเก็บรวบรวมไว้ในโรงเก็บก่อนนำออกมาใช้เลี้ยงสัตว์

3.2.2 อาหารข้น ผสมขึ้นจากวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น ประกอบด้วยมันเส้น ข้าวโพดบด ปลาช่อน รำละเอียด ข้าว เป็นแหล่งของพลังงาน ใช้กากถั่วเหลืองและยูเรียเป็นแหล่งของโปรตีน ใช้ไคคล์เซียมฟอสเฟต บุนขาว กะมะถัน และเกลือป่น เป็นแหล่งของแร่ธาตุประกอบสูตรอาหารโดยเสริมด้วยเมล็ดยี่สิบที่ระดับ 0, 20, 40 และ 60% ตามลำดับ สูตรอาหารทุกสูตรปรับให้มีเปอร์เซ็นต์โปรตีน และพลังงานเท่ากัน (isonitrogenous และ isocaloric) มีส่วนประกอบทางเคมีจากการคำนวณ คือโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ประมาณ 16% และพลังงานที่ย่อยได้ทั้งหมด (total digestible nutrient, TDN) ประมาณ 82% ส่วนประกอบของอาหารข้นและราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการผสมสูตรอาหาร แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

#### 3.2.3 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) ให้เพศเป็นบล็อก มี 4 ทรีทเมนต์ในแต่ละ ทรีทเมนต์ ประกอบด้วย 3 ซ้ำ ทรีทเมนต์ ทั้ง 4 เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงโค ดังนี้

- ทรีทเมนต์ที่ 1 อาหารสูตรควบคุมไม่เสริมเมล็ดยี่สิบ
- ทรีทเมนต์ที่ 2 อาหารที่เสริมด้วยเมล็ดยี่สิบ 20%
- ทรีทเมนต์ที่ 3 อาหารที่เสริมด้วยเมล็ดยี่สิบ 40%
- ทรีทเมนต์ที่ 4 อาหารที่เสริมด้วยเมล็ดยี่สิบ 60%

**ตารางที่ 2** แสดงส่วนประกอบของอาหารชั้น (คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักสด)

| ส่วนประกอบ                                         | สูตรอาหาร |       |       |       |
|----------------------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                                                    | 1         | 2     | 3     | 4     |
| มันสำปะหลัง (มันเส้น)                              | 31.1      | 24.8  | 15.7  | 3.3   |
| ข้าวโพดบด                                          | 23.0      | 7.5   | 4.9   | 3.0   |
| รำละเอียด                                          | 13.5      | 22.9  | 19.2  | 26.8  |
| ปลายข้าว                                           | 12.7      | 16.5  | 15.8  | 2.3   |
| เมล็ดฝ้าย                                          | –         | 20.0  | 40.0  | 60.0  |
| กากถั่วเหลือง                                      | 13.9      | 4.1   | 0.4   | –     |
| ยูเรีย                                             | 1.3       | 1.3   | 0.7   | 0.1   |
| ไดแคลเซียม ฟอสเฟต                                  | 0.4       | 0.4   | 1.0   | 2.0   |
| ปูนขาว                                             | 0.6       | 1.0   | 1.1   | 1.6   |
| โซว                                                | 2.9       | 1.1   | –     | –     |
| กัมมะถัน                                           | 0.3       | 0.2   | 0.3   | 0.4   |
| เกลือ                                              | 0.3       | 0.2   | 0.9   | 0.6   |
| รวม                                                | 100.0     | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| ราคา (บาท/กก.)                                     | 4.9       | 4.1   | 3.8   | 3.6   |
| ส่วนประกอบทางเคมีโดยการคำนวณ (calculated analysis) |           |       |       |       |
| โปรตีนหยาบ (CP, %)                                 | 16.3      | 16.1  | 16.3  | 16.9  |
| พลังงานที่ย่อยได้ทั้งหมด (TDN, %)                  | 81.8      | 81.3  | 82.8  | 83.4  |

**ตารางที่ 3** แสดงราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการผสมสูตรอาหาร 1/

| วัตถุดิบ              | ราคา (บาท/กก.) |
|-----------------------|----------------|
| มันสำปะหลัง (มันเส้น) | 3.7            |
| ข้าวโพดบด             | 4.0            |
| รำละเอียด             | 3.5            |
| ปลายข้าว              | 4.5            |
| เมล็ดฝ้าย             | 3.5            |
| กากถั่วเหลือง         | 9.4            |
| ยูเรีย                | 5.8            |
| โดแคลเซียมฟอสเฟต      | 4.1            |
| ปูนขาว                | 2.4            |
| โซลิว                 | 10.5           |
| กัมมะถัน              | 11.8           |
| เกลือ                 | 2.7            |

1/ ราคาระหว่างเดือนสิงหาคม 2537-พฤศจิกายน 2537 (ราคาจากร้านอาหารสัตว์ใน  
จ.ขอนแก่น)

### 3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 ในระยะก่อนการทดลอง (preliminary period) ช้างโคในคอกรวมขนาดคอก 4x6 ตารางเมตร ที่มีรางอาหารและอ่างน้ำพอเพียง ให้โคทุกตัวได้รับฟางข้าวแบบเต็มที่ (ad lib) ร่วมกับอาหารข้น ในช่วงนี้ทำการถ่ายพยาธิ และฉีดวัคซีนป้องกันโรค (ตามรายละเอียดในข้อที่ 3.1)

3.4.2 สุ่มสัตว์เข้าทดลองตามแผนการทดลอง โดยแบ่งโคออกเป็น 2 บล็อก ตามเพศ แล้วสุ่มทรีทเมนต์ ลงในบล็อกโคที่ได้รับ ทรีทเมนต์เดียวกัน จะขังในคอกเดียวกัน โดยการเลี้ยงผูกยืนโรงคอกละ 3 ตัว มีถังน้ำอยู่หน้าคอก และมีน้ำสะอาดเต็มให้กินตลอดเวลา

3.4.3 ระยะปรับสัตว์ (adjusting period) ทำการปรับสัตว์เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงแบบผูกยืนโรง และอาหารในแต่ละทรีทเมนต์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.4.4 ระยะทำการทดลอง (experimental period) ทำการชั่งน้ำหนักโคทุกตัวเมื่อเริ่มต้นการทดลองให้อาหารตามทรีทเมนต์ ที่สุ่มให้กับสัตว์ในอัตรา 3% ของน้ำหนัก สัตว์ส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้นเท่ากับ 30:70 และปรับปริมาณการให้อาหารตามน้ำหนักตัวทุกเดือน ในระหว่างการทดลองทำการเก็บข้อมูลต่างๆ คือ ปริมาณการกินอาหารต่อวัน การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว ตัวอย่างน้ำรูเมน (rumen fluid) ตัวอย่างเลือด ตัวอย่างอาหาร และตัวอย่างมูล

### 3.5 การเก็บข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

3.5.1 บันทึกปริมาณการกินอาหารที่โคกินทุกวัน ตรวจวัดปริมาณอาหารหยาบและอาหารข้นที่เหลือต่อวันก่อนให้อาหารเช้า โดยการนำอาหารทั้งหมดที่เหลือมาชั่งน้ำหนัก ให้อาหาร 2 ครั้ง ช่วงเช้าเวลา 07.30 น. และช่วงบ่ายเวลา 16.00 น.

3.5.2 บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโค ทำการชั่งน้ำหนักเป็นประจำทุกเดือนในตอนเช้าก่อนให้อาหาร ก่อนชั่งคอกอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่มีน้ำให้กินตลอดเวลา คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และปริมาณการกินได้

3.5.3 การเก็บตัวอย่างอาหาร สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหยาบ (ฟางข้าว) และอาหารข้น ทุกช่วงของการผสมอาหาร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี คือ วัตถุแห้ง (DM), เถ้า (ash), โปรตีนหยาบ (CP) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1985) และหา neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL) ตามวิธีการของ Georing and Van Soest (1970) และเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) โดยวิธีการของ Van Keulen and Young (1977)

3.5.4 การเก็บตัวอย่างมูล สุ่มเก็บตัวอย่างมูลของโคทั้ง 24 ตัว ในระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง นานติดต่อกัน 2 วัน เก็บวันละ 1 ครั้งในช่วงเช้า โดยเก็บมูลจากกองบนพื้น (grab sampling) เอาเฉพาะส่วนปลายที่ไม่มีการปลอมปนของสิ่งอื่น น้ำตัวอย่างเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

เพื่อการวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (DM), เถ้า (ash), โปรตีนหายาบ (CP), NDF และ AIA ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.5.3

3.5.5 เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจาก jugular vein จากโคแต่ละตัวเพื่อนำมาวิเคราะห์หา ความเข้มข้นของยูเรีย-ไนโตรเจนในเลือด (BUN) ในช่วงเวลาที่ 0 และ 4 หลังการให้อาหารเข้า ระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง (ภาพผนวกที่ 1) นำมาวิเคราะห์ตามวิธีการของ Crocker (1967)

3.5.6 เก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ของโคทุกตัวในช่วงเวลาที่ 0 และ 4 หลังการให้อาหารเข้าระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง โดยใช้ stomach tube หรือ suction strainer และเครื่องดูดระบบสุญญากาศ (vacuum pump) สูดดูดเอาน้ำรูเมนออกมาประมาณ 150-200 มล./ตัว (ภาพผนวกที่ 2) วัดความเป็นกรดและด่าง (pH) ทันที โดยใช้เครื่อง pH meter (ภาพผนวกที่ 3) จากนั้น ตวงให้ได้ปริมาณ 100 มล. เติมกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 6 N จำนวน 5 มล. เพื่อหยุดขบวนการหมักของจุลินทรีย์ จากนั้นนำเข้าตู้แช่แข็ง เพื่อรอการวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) และกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acids, VFA) น้ำรูเมนส่วนที่เหลือเติมฟอร์มาลีน เพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (total bacterial count) ตามวิธีการของ Galyean (1989) และจำนวนของโปรตีนตัวตามวิธีการของ Dehority (1984)

3.5.7 การวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) นำตัวอย่างน้ำรูเมนออกจากตู้แช่แข็งทิ้งไว้จนละลาย แล้วนำไปเหวี่ยงใส่ (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นจึงรินน้ำใส (supernatant) ออกมาวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยเครื่อง Ammonia Electrode (ภาพผนวกที่ 4) โดยเทียบค่าสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมคลอไรด์ในกราฟเซมิ-ล็อก (semi-log) ตามวิธีการของศักดิ์สิทธิ์และคณะ (2531)

3.5.8 การวิเคราะห์หา volatile fatty acids (VFA) นำตัวอย่างน้ำรูเมนส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.6.7 มาตรวจวัด ตามวิธีการของ Briggs et al. (1957)

3.5.9 เมื่อทำการทดลองครบ 120 วัน จึงสิ้นสุดการทดลอง สำหรับโคเพศผู้นำไปฆ่าและเพื่อศึกษาซาก โดยการทำตัดแต่งแบบสากล (ภาพผนวกที่ 5) ตามวิธีของชัยณรงค์ (2529) สุ่มเนื้อสันนอกเพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีแบบประมาณ (proximate analysis) ตามวิธีการของ AOAC (1985)

### 3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

หาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนาด้วยวิธีใช้ตัวบ่งชี้ภายใน คือ acid-insoluble ash (AIA) ตามวิธีการของ Van Keulen and Young (1977) และการคำนวณตามวิธีการของ Schnieder and Platt (1975) และเมธา (2533)

$$\begin{aligned}
 \text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของวัตถุดิบ} &= 100 - 100 \frac{\% \text{AIA ในอาหาร}}{\% \text{AIA ในมูล}} \\
 (\% \text{ dry matter}) & \\
 \\
 \text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนา} &= 100 - 100 \frac{\% \text{AIA ในอาหาร}}{\% \text{AIA ในมูล}} \times \frac{\% \text{โภชนาในมูล}}{\% \text{โภชนาในอาหาร}} \\
 (\% \text{ digestion coefficient}) & \\
 \\
 \text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน*} &= \frac{\text{น.น. ที่ช่วงเดือนที่ 2} - \text{น.น. ที่ช่วงเดือนที่ 1}}{\text{จำนวนวันของการทดลอง (จากเดือนที่ 1 ไป เดือนที่ 2)}} \\
 (\text{average daily gain, ADG}) & \\
 \\
 \text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว*} &= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กก.)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่ม (กก.)}} \\
 (\text{feed conversion ratio, FCR}) & \\
 \\
 \text{เปอร์เซ็นต์ซากสด} &= \frac{\text{น้ำหนักซากสด}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100 \\
 (\text{warm carcass percentage}) & \\
 \\
 \text{เปอร์เซ็นต์ซากเย็น} &= \frac{\text{น้ำหนักซากเย็น}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100 \\
 (\text{chilled carcass percentage}) &
 \end{aligned}$$

หมายเหตุ \* หมายถึงทำการคำนวณเป็นประจำวันทุกเดือน

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการทดลอง นำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีของ Steel and Torrie (1980)

### 3.8 ระยะเวลาทดลอง

- 3.8.1 ระยะปรับสัตว์ทดลอง 14 วัน
- 3.8.2 ระยะทดลองในสัตว์ 120 วัน  
(1 สิงหาคม 2537-28 พฤศจิกายน 2537)
- 3.8.3 ระยะเวลาการวิเคราะห์ทางเคมี 60 วัน
- รวมระยะเวลาประมาณ 194 วัน

### 3.9 สถานที่ทำการทดลอง

- 3.9.1 ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
- 3.9.2 ศูนย์วิจัยอาหารสัตว์ขอนแก่น กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์
- 3.9.3 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น