

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 factorial arrangement in Latin square โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย A เป็นแหล่งของไบฟิซ มี 2 แหล่ง คือ

- ไบกระถินป่น (LC)
- ไบมันสำปะหลังป่น (CS)

ปัจจัย B เป็นระดับของโปรตีน มี 2 แหล่ง คือ

- 10 %CP
- 14 %CP

อาหารทดลองมี 4 สูตร ดังนี้

สูตร	สัญลักษณ์สูตรอาหาร	ชนิดของไบฟิซ	ระดับของโปรตีน(%)
1	10 %LC	LC	10
2	10 %CS	CS	10
3	14 %CS	CS	14
4	14 %LC	LC	14

LC = ไบกระถิน

CS = ไบมันสำปะหลัง

layout 2 x 2 factorial in Latin square

ช่วงการทดลอง	สัตว์ตัวที่ 1	สัตว์ตัวที่ 2	สัตว์ตัวที่ 3	สัตว์ตัวที่ 4
1	10 %LC	10 %CS	14 %CS	14 %LC
2	10 %CS	14 %CS	14 %LC	10 %LC
3	14 %CS	14 %LC	10 %LC	10 %CS
4	14 %LC	10 %LC	10 %CS	14 %CS

3.2. สัตว์ทดลอง

ใช้กระบือปลักเพศผู้ 4 ตัว อายุประมาณ 3 ปี น้ำหนักตัว 262-292 กิโลกรัม การจัดการกระบือในช่วงปรับสัตว์ก่อนเข้างานทดลอง ทำการถ่ายพยาธิตัวกลมด้วยยา พามีโซน ถ่ายพยาธิใบไม้ในตับด้วยการฉีดยา ไทรแตรก (Trodax) ฉีดวิตามิน AD₃E ฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย ฉีดวัคซีนป้องกันโรคคอบวม

3.3. ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทดลองวันที่ 3 กุมภาพันธ์ - 13 เมษายน พ.ศ. 2537

- ระยะปรับสัตว์ ใช้เวลา 14 วัน

- ระยะทดลอง ใช้เวลา 56 วัน

รวมเวลาทั้งสิ้น 70 วัน

หมายเหตุ: การทดลองมีทั้งหมด 4 ช่วงการทดลอง แต่ละช่วงใช้เวลาทดลอง 14 วัน

3.4. อาหารทดลอง

อาหารหยาบ ใช้ฟางจากข้าวนาปี โดยรับซื้อจากเกษตรกรในเขตจังหวัดขอนแก่น

อาหารข้น ใช้จากโรงงานอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยอาหารข้นจะประกอบไปด้วย 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1

เป็นอาหารชั้นที่ใช้กับสัตว์ทดลองในช่วงปรับสัตว์ โดยในสูตรอาหารทดลองนี้จะมีไขมันสำปะหลังและใบกระถินเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยและมีระดับของโปรตีนในช่วง 12 เปอร์เซ็นต์โปรตีนหยาบ ดังแสดงในตารางที่ 9

ส่วนที่ 2

เป็นอาหารชั้นที่ใช้สำหรับทดลอง มี 4 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงสัดส่วนของวัตถุดิบอาหารชั้นในอาหารสูตรปรับและในอาหารทดลองแต่ละสูตร

องค์ประกอบของวัตถุดิบ	อาหารทดลอง (กก.)				
	สูตรปรับ	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
มันเส้น	35.4	32.7	37.4	33.9	29.1
รำละเอียด	12.5	17.9	10.0	8.0	16.1
ปลายข้าว	18.0	24.4	24.0	17.0	18.1
กากถั่วเหลือง	17.4	5.2	8.3	17.8	11.6
ปลาป่น	5.4	2.5	3.0	4.7	6.5
ใบกระถินป่น	4.6	15.0	-	-	15.0
ไขมันสำปะหลังป่น	4.6	-	15.0	15.0	-
ยูเรีย	0.9	1.0	1.0	2.2	2.1
ไคแคลเซียมฟอสเฟต 4%	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3
กำมะถัน	0.7	0.1	0.1	0.2	0.2
เกลือ	-	1.0	1.0	1.0	1.0
รวมทั้งหมด	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

การคำนวณสูตรอาหารชั้น อาศัยความต้องการโภชนาจาก Kearn (1982) ตารางที่ 16 หน้าที่ 109 เป็นหลักในการประกอบสูตรอาหารสัตว์ โดยกระบือที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีน้ำหนักประมาณ 262-292 กิโลกรัม ได้เป็นสูตรอาหารที่มีโภชนาตามที่ต้องการ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงสัดส่วนของโภชนะในอาหารทดลอง

	โปรตีน หยาบ	โปรตีนไหล ผ่าน	ทีดีเอ็น	พลังงานที่ ใช้ในการเผา ผลาญ	แคลเซียม : ฟอสฟอรัส
	----- %	-----	-----	-----	-----
			เม็กกะกิโลแคลอรี/กก.		%
สูตรปรับ	12.00	25.54	61.63	2.34	1.6 : 1
สูตรที่ 1	10.00	24.64	61.43	2.33	1.6 : 1
สูตรที่ 2	10.00	26.78	60.46	2.29	1.6 : 1
สูตรที่ 3	14.00	26.52	60.00	2.27	1.6 : 1
สูตรที่ 4	14.00	24.76	60.98	2.31	1.6 : 1

3.5. วิธีการทดลอง

3.5.1. ก่อนการทดลอง (preliminary period) ให้กระบือทุกตัวได้รับฟางร่วมกับอาหารข้นสูตรปรับพื้นฐานเหมือนกันทุกตัว เป็นเวลา 14 วันทุกตัว ในช่วงนี้ทำการถ่ายพยาธิและฉีดวัคซีนป้องกันโรค ตามรายละเอียดในข้อ 3.2.

3.5.2. สุ่มสัตว์เข้าทดลองตามแผนทดลองแบบ ลาตินสแควร์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ช่วง (4 ซ้ำ) การทดลองในแต่ละช่วงการทดลองสัตว์จะได้รับอาหารตัวละ 1 สูตรที่แตกต่างกัน 4 สูตร เมื่อทดลองไปครบ 1 ช่วง กระบือแต่ละตัวจะถูกเปลี่ยนไปรับอาหารสูตรอื่นๆ โดยไม่ซ้ำกันจนครบทุก 4 สูตร และตลอดการทดลองสัตว์จะถูกเลี้ยงอยู่บนกรงเมทาโบลิซึม (metabolism crate)

3.5.3. ในแต่ละช่วงของการทดลองใช้เวลา 14 วัน โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ 7 วันแรกเป็นระยะปรับสัตว์ให้สัตว์คุ้นเคยกับสูตรอาหารทดลองที่สุ่มได้ ระยะ 7 วันหลังเป็นระยะเก็บตัวอย่าง (collection period) โดยจะทำการเก็บปัสสาวะและมูลในวันที่ 7-14 ของช่วงการทดลอง ส่วนเลือดและน้ำรูเมน (rumen fluid) จะทำการสุ่มเก็บในวันสุดท้ายของช่วงการทดลอง

การเลี้ยงกระบือในระยะปรับสัตว์และในระยะทดลอง กระบือแต่ละตัวจะถูกขังในกรงที่แยกจากกัน โดยแต่ละกรงจะมีรางอาหารหยاب อาหารข้นและน้ำ เฉพาะตัวไม่รวมกัน การให้อาหาร ให้กินวันละ 2 ครั้ง เท่าๆ กัน ในเวลา 08:00 น. และ 16:30 น. มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา ทำความสะอาดและให้น้ำแก่สัตว์ทุกวัน

หมายเหตุ: สัดส่วนของอาหารหยاب : อาหารข้น ที่กินคิดเป็น 50 : 50 โดยให้สัตว์กินประมาณ

2.6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว

3.6. การเก็บข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

3.6.1 บันทึกน้ำหนักตัวของกระบือทุกตัว ก่อนเข้าทำการทดลอง

3.6.2. เก็บตัวอย่างอาหารข้นและอาหารหยاب เพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร คือหาเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (%DM), โปรตีนหยاب (%CP), เถ้า (%Ash) ตามวิธีมาตรฐาน A.O.A.C. (1985) และหา neutral detergent fiber (NDF) acid detergent fiber (ADF) และ acid detergent lignin (ADL) ตามวิธีของ Georing and Van Soest (1970) และนำค่าที่ได้มาหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะ (coefficient digestibility)

3.6.3. เก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะที่เส้นเลือดค้ำที่คอ (jugular vein) เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรีย-ไนโตรเจนของเลือด (blood urea nitrogen, BUN) ในวันเดียวกับการสุ่มของเหลวในรูเมน (rumen fluid) โดยจะทำการเจาะเลือด 4 ช่วงเวลา คือ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร หลังจากนั้นนำเลือดที่ได้มาหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่ใสมาบรรจุหลอดพลาสติก นำไปแช่แข็งที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หายูเรีย-ไนโตรเจนในเลือดต่อไป

3.6.4. ในวันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลอง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน (rumen fluid) ของกระบือ โดยเก็บตัวอย่างที่ 4 ชั่วโมง หลังการให้อาหารโดยใช้ท่อหยงแช่ลงในกระเพาะเพื่อดูดเอาของเหลวในกระเพาะรูเมนออกมา ประมาณ 200-300 มิลลิลิตร นำมาวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทันทีด้วยเครื่อง pH./temperature meter รุ่น 671 หลังจากวัดความเป็นกรด-ด่างเสร็จจะสุ่มเก็บน้ำรูเมนไว้ประมาณ 75 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติก

เติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 โมล. 5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดขบวนการหมักของ จุลินทรีย์ จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเอาส่วนน้ำที่ใส (supernatant) บรรจุลงในขวด 25 มิลลิลิตร และนำมาเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งเพื่อรอการวิเคราะห์หากรด ไขมันระเหยได้ (VFA) และแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ต่อไป

3.6.5. การวัดแอมโมเนีย-ไนโตรเจน นำตัวอย่างของเหลวในรูเมนออกจากตู้แช่แข็ง ทิ้งไว้ให้ละลายและให้มีอุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิเดียวกับสารละลาย เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 โมล. 0.25 มิลลิลิตร และวัดด้วยเครื่อง ammonia electrode orion model 501 digital analyzer โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ในกราฟ semi-log

3.6.6. การหากรดไขมันระเหยได้ทั้งหมด (total VFA) นำตัวอย่างของน้ำรูเมนที่ ทำการหมუნเหวี่ยงแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในเคจคัลฟลาส (kjedahl flask) เติมสารละลายอิ่มตัว ของแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องกลั่นและเก็บส่วนที่กลั่นได้ปริมาณ 150 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาเลอิน (phenolphthalein indicator) 3 หยด นำมาไตเตรทด้วยสารละลาย มาตรฐาน 0.25 N ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนถึงจุดเอนพอยท์ (end point) ได้สารละลายสีชมพูอ่อนนำค่าที่ได้ไปคำนวณสูตรดังนี้

$$\text{m. mole TVFA/litre} = \frac{1,000 \times (\text{titre sample} - \text{titre blank}) \times \text{normality of NaOH}}{\text{จำนวน มิลลิลิตรของ rumen fluid}}$$

หมายเหตุ: ใช้สารละลาย acetic acid 100 มิลลิโมล เพื่อหาค่า recovery ของเครื่องกลั่น ควร มีค่า recovery ประมาณ 100 %

3.6.7. การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ เก็บโดยใช้ถังพลาสติกความจุ 25 ลิตร รองรับในถัง พลาสติกเดิม 100 มิลลิลิตร ของ 10 % H_2SO_4 โดยใช้ pH ของปัสสาวะที่มีค่าต่ำกว่า 3 ทั้งนี้เพื่อ ชัดขวางกิจกรรมของแบคทีเรียในการย่อยสลายไนโตรเจนในปัสสาวะ นอกจากนั้นยังป้องกันการ ระเหยของไนโตรเจน ทำการสุ่มเก็บปัสสาวะในช่วงหลังของช่วงการทดลอง คือในวันที่ 7-14 ของช่วงการทดลอง โดยจะทำการชั่งน้ำหนักของปัสสาวะทั้งหมดในแต่ละวันของแต่ละตัวสัตว์ที่ ได้รับอาหารแต่ละสูตรของช่วงการทดลอง แล้วเทใส่ถังคนให้เข้ากันแล้วทำการสุ่มตัวอย่างมา 5

เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรีดสัตว์ทั้งหมด เก็บไว้ในถุงพลาสติกนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง เมื่อทดลองไปเสร็จแต่ละช่วงการทดลอง นำปัสสาวะทั้ง 7 วัน ของแต่ละตัว ในแต่ละสูตรอาหารมารวมและคนให้เข้ากัน สุ่มเก็บมา 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปแช่แข็งเพื่อการวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของฟิวรีน ด้วย HPLC ตามกรรมวิธีของ Balcells et al. (1992) ต่อไป

3.6.8. การเก็บตัวอย่างมูลเริ่มทำการเก็บพร้อมกับการเก็บปัสสาวะ ตามข้อที่ 3.6.7. โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างในช่วงเช้า เวลา 7:00 น. โดยใช้วิธีชั่งมูลทั้งหมด จากนั้นทำการคลุกเคล้ามูลให้เข้ากัน แบ่งมูลส่วนหนึ่งมา 1 กิโลกรัม นำไปแช่แข็งเมื่อทดลองเสร็จแต่ละการทดลอง นำมูล 1 กิโลกรัม ของแต่ละตัวสัตว์ในแต่ละสูตรทดลอง ของช่วง 7 วัน มาคลุกเคล้ากัน สุ่มเก็บมา 1 กิโลกรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้งของมูลในแต่ละช่วงการทดลอง อีกส่วนหนึ่งสุ่มเก็บมา 5 เปอร์เซ็นต์ ทำเช่นเดียวกับการสุ่มเก็บ 1 กิโลกรัมข้างต้น แต่จะแตกต่างกันที่มูล 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำการสุ่มเก็บจากมูลทั้ง 7 วันของแต่ละตัวสัตว์ ในแต่ละสูตรทดลองของช่วงการทดลอง จะนำมาอบที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้งแล้วนำไปบดผ่านตะแกรง 0.1 มิลลิเมตร เก็บไว้ในถุงพลาสติกเพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของมูล โดยจะทำเหมือนกันกับอาหารหยาบและอาหารข้น

3.7. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะด้วยวิธีชั่งน้ำหนักของตัวอย่างทั้งหมด (total collection) ใช้การคำนวณตามวิธีการของ Schneider and Platt (1975) คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของ} = 100 - 100 \times \frac{\text{น้ำหนักมูลทั้งหมด (น้ำหนักแห้ง)}}{\text{น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมด (น้ำหนักแห้ง)}}$$

วัตถุแห้ง (dry matter)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของ} = 100 - 100 \times \frac{\% \text{ โภชนะในมูล } \times \% \text{ น้ำหนักมูลทั้งหมด}}{\% \text{ โภชนะในอาหาร } \times \text{น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมด}}$$

โภชนะ

3.8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการทดลอง นำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (analysis of variance) แบบ 2 x 2 factorial arrangement in Latin square โดยใช้ Proc ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของอาหารแต่ละสูตรด้วยวิธีการของ Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีของ S.A.S. (Steel and Torrie, 1980)