

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการทดลอง

3.1.1 การทดลองมี 3 กลุ่มทดลอง

โดยวิธีการสุ่มโคกลุ่ม 2 ตัว วางแผนการทดลองแบบ Switch back design ชนิด 2 สลับ (Lucas, 1956) ซึ่งมีความไว(sensitive) และมีความคลาดเคลื่อนต่ำ ทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างวิธีเมนต์ได้ดี (จรัญ, 2534) โดยใช้โคทดลองจำนวน 6 ตัว แบ่งเป็น 3 ระยะการทดลอง ระยะการทดลองละ 28 วัน รวมทั้งสิ้น 84 วัน

3.1.2 การแบ่งกลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลอง คือ

สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งโดยสุ่มเป็น 3 กลุ่มละ 2 ตัว โดยในแต่ละกลุ่มจะได้รับหญ้า รุขี้แห้งเป็นอาหารหลัก สัตว์ในแต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารชั้นต่างกัน โดย

กลุ่มทดลอง A เป็นสูตรอาหารควบคุม (Control)

B เป็นสูตรอาหารควบคุมเสริมด้วยอาหารเม็ดคุณภาพสูงที่มีโปรตีนที่ ไม่ถูกย่อยสลาย 27.5 % จำนวน 500 กรัม/ตัว/วัน

C เป็นสูตรอาหารควบคุมเสริมด้วยอาหารเม็ดคุณภาพสูงที่มีโปรตีนที่ ไม่ถูกย่อยสลาย 35.0 % จำนวน 500 กรัม/ตัว/วัน

การสุ่มสัตว์ทดลองจะสุ่มสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่ม เพื่อเลือกว่ากลุ่มใดจะได้รับอาหารทดลองชนิดใดตามแผนการทดลอง โดยในกลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ตัว ในระยะที่ 1 จะได้รับอาหารสูตร A ส่วนในระยะที่ 2 แต่ละตัวจะถูกแยกออกจากกัน คือ ได้รับอาหารสูตร

B และสูตร C อย่างละ 1 ตัว ในระยะที่ 3 โคทั้ง 2 ตัว จะกลับมารับอาหารสูตร A อีกครั้ง

ในโคกลุ่มที่ 2 จะได้รับอาหารสูตร B ในระยะที่ 1 จำนวน 2 ตัว ส่วนในระยะที่ 2 แต่ละตัวจะถูกแยกออกจากกัน คือ ได้รับอาหารสูตร C และสูตร A อย่างละ 1 ตัว ในระยะที่ 3 โคทั้ง 2 ตัว จะกลับมารับอาหารสูตร B อีกครั้ง

ในโคกลุ่มที่ 3 จะได้รับอาหารสูตร C ในระยะที่ 1 จำนวน 2 ตัว ส่วนในระยะที่ 2 แต่ละตัวจะถูกแยกออกจากกัน คือ ได้รับอาหารสูตร A และสูตร B อย่างละ 1 ตัว ในระยะที่ 3 โคทั้ง 2 ตัว จะกลับมารับอาหารสูตร B อีกครั้ง ดังแผนการทดลอง

แผนผังการทดลอง

ระยะทดลอง	ตัวสัตว์					
	1	2	3	4	5	6
1 (28 วัน)	A	B	C	A	B	C
2 (28 วัน)	B	C	A	C	A	B
3 (28 วัน)	A	B	C	A	B	C

3.2 สัตว์ทดลอง

1. ใช้โคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน ซึ่งมีสายเลือดในช่วง 75% อยู่ในช่วงของการให้นมที่ 3-5 และอยู่ในช่วงการให้นมสูงสุด(peak) จำนวน 6 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย 470 ± 50 kg

2. ทำเครื่องหมายสัตว์ทุกตัวโดยการติดเบอร์ที่หู ฉีดวิตามิน AD_3E ตัวละ 10 ml และสัตว์ทุกตัวถูกขังในคอกขังเดียว

3.3 วัตถุดิบอาหารสัตว์และการเตรียมอาหารทดลอง

3.3.1 อาหารหยาบใช้หญ้าแห้ง (ruzi hay) ตลอดช่วงการทดลอง

3.3.2 อาหารข้นใช้อาหารข้นของ บริษัทแหลมทองเกษตรภัณฑ์ จำกัด เป็นอาหารควบคุม (Control) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับโคระยะอ้วนท้องและระยะให้นม

3.3.3 เตรียมอาหารเม็ดคุณภาพสูง โดยมีวัตถุดิบประกอบด้วย รำข้าว, กากถั่วเหลือง, ปลาลิ้น, กากน้ำตาล(molasses), ยูเรีย, ไขมัน, ข้าวโพดบด (corn meal), ปลาขี้ขาว และซีเมนต์ ซึ่งมีระดับของเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ไม่ถูกย่อยสลายในรูเมน 27.5 และ 35.0 ตามลำดับ โดยปรับให้ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนหยาบเท่ากัน (iso-nitrogenouse) ด้วยยูเรีย สำหรับองค์ประกอบของวัตถุดิบอาหารทั้ง 2 สูตร แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของอาหารเม็ดคุณภาพสูง

วัตถุดิบ	ส่วนประกอบ (%)	
	สูตรที่ 1 (HQFP 1)	สูตรที่ 2 (HQFP 2)
ข้าวโพดบด	3.55	17.76
รำละเอียด	15.89	11.21
กากน้ำตาล	20.56	18.70
ปลาขี้ขาว	13.55	3.22
กากถั่วเหลือง	19.44	6.45
ยูเรีย	6.05	3.79
ปลาลิ้น	3.93	23.36

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของอาหารเม็ดคุณภาพสูง (ต่อ)

วัตถุดิบ	ส่วนประกอบ (%)	
	สูตรที่ 1 (HQFP 1)	สูตรที่ 2 (HQFP 2)
แร่ธาตุ		
โคแคลเซียมฟอสเฟต	2.80	0.47
เกลือแกง	0.93	2.90
ปูนขาว	1.87	-
กำมะถัน	1.15	3.74
โซว	3.74	1.87
ซีเมนต์	6.54	6.54
รวม	100.00	100.00

ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบทางโภชนาของอาหารเม็ดคุณภาพสูง

รายการ	สูตรที่ 1 (HQFP 1)	สูตรที่ 2 (HQFP 2)
CP (%)	35.03	35.14
UDP (%)	27.53	35.02
TDN (%)	72.21	72.68
ME (Mcal)	2.82	2.84
Ca:P	1.83:1	1.78:1
ราคา (บาท/กก.)	5.12	6.81

3.4 การให้อาหารสัตว์ทดลอง

3.4.1 ระยะปรับสัตว์ทดลอง (preliminary period) ให้สัตว์ทุกตัวได้รับหญ้าเฮย์ (ruzi hay) แบบเต็มที่ (ad lib) ร่วมกับอาหารชั้นสูตรควบคุม (สูตร A) ซึ่งมีระดับโปรตีนในอาหาร 16% เป็นเวลา 7 วัน และมีน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา

3.4.2 ระยะทดลอง (experimental period) แบ่งเป็น 3 ระยะการทดลอง แต่ละระยะการทดลองใช้เวลา 28 วัน โดยวันสุดท้ายของแต่ละระยะทดลองจะเป็นช่วงเก็บข้อมูล, สุ่มตัวอย่าง (collection period)

3.4.3 การให้อาหาร ให้ตามกลุ่มทดลองที่สุ่มให้แก่สัตว์ โดยมีเบอร์เซ็นต์การกินได้ทั้งหมดเท่ากับ 3.5% ของน้ำหนักตัว คิดเป็นสัดส่วนของอาหารหยาบต่ออาหารชั้นได้ประมาณ 40 : 60 (43.92 : 56.08) โดยให้สัตว์ได้รับอาหารหยาบเต็มที่ สัดส่วนปริมาณน้ำนมต่ออาหารที่ให้เท่ากับ 2 : 1

3.5 การเก็บข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

3.5.1 บันทึกปริมาณการกินได้อย่างอิสระของอาหารหยาบทุกครั้งที่ได้รับอาหารหยาบ จะชั่งน้ำหนักก่อนให้และหญ้าเฮย์ที่เหลือจะชั่งออกมาในตอนเช้าของวันถัดไป ก่อนให้อาหารในตอนเช้า

3.5.2 บันทึกปริมาณน้ำนมที่รีดได้จากแม่โคแต่ละตัวในตอนเช้า 5.30 น. และตอนเย็น 16.30 น. ทุกวันตลอดการทดลอง

3.5.3 เก็บตัวอย่างอาหารชั้น อาหารหยาบ ในระหว่างการทดลองทุกๆ collection period เพื่อเตรียมการวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี คือ เถ้า (ash) วัตถุแห้ง (% DM) โปรตีนหยาบ (CP) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1985) และหา neutral detergent fiber (NDF) , acid detergent fiber (ADF) และ acid detergent lignin (ADL) ตามวิธีการของ Georing and Van soest (1970) เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash ; AIA) เพื่อวิเคราะห์

การย่อยได้ของโภชนะ ตามวิธีการของ Van Keulen and Young (1977) และ คำนวณตามวิธีการของ Schnieder and Flatt (1975)

3.5.4 เก็บตัวอย่างมูลของสัตว์ทุกตัวในแต่ละระยะการทดลอง โดยเก็บในช่วงเช้า ซึ่งเป็นมูลที่ถ่ายออกมาใหม่ ๆ ที่ไม่มีการปนเปื้อนของดิน นำตัวอย่างเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารสัตว์

3.5.5 สุ่มของเหลวจากกระเพาะหมัก โดยใช้ stomach tube ร่วมกับ vacuum pump จากสัตว์แต่ละตัว ในช่วงเวลาหลังการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด วัด pH ทันทีด้วยเครื่องวัด pH สนาม จากนั้นตวงให้ได้ปริมาณ 95 cc. เติมกรด HCl 6N ปริมาณ 5 cc. เพื่อหยุดการหมักของของจุลินทรีย์ แช่แข็งไว้รอการวิเคราะห์หา total volatile fatty acid (TVFA) และแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ตามวิธีที่เสนอโดย Chanthai *et al.* (1988) ตวง rumen fluid ส่วนที่เหลือ ปริมาณ 90 cc. เติมฟอร์มาลีน 10% ปริมาณ 10 cc. เพื่อรอการตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (bacterial count) ตามวิธีของ Galyean (1989) และจำนวนโปรโตซัว (protozoal count) ตามวิธีของ Dehority (1984)

3.5.6 ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจาก jugular vein จากสัตว์แต่ละตัว เพื่อนำมาวิเคราะห์หา blood urea nitrogen (BUN) ในชั่วโมงที่ 4 หลังการให้อาหารเข้า ในวันเดียวกับการสุ่มของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid)

3.5.7 สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมทุก 2 สัปดาห์ โดยเก็บในตอนเช้าและตอนเย็น นำมารวมเข้าด้วยกัน เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญ คือ เบอร์เซ็นต์ไขมัน, โปรตีนของแข็งทั้งหมด (total solids, TS) และของแข็งไม่รวมไขมัน (solids not fat, SNF) ตามวิธีการของ AOAC (1985)

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่าง ๆ จากการทดลอง ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Switch back design โดยใช้

Proc GLM (SAS, 1985) และใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torries, 1980)

3.7 การทดลองหาอัตราการย่อยสลายของอาหารโดยวิธี in sacco

อาหารทั้ง 3 สูตรที่ผสมขึ้นมานั้น จะนำไปทดสอบหาอัตราการย่อยสลายของโภชนะที่ไม่ถูกย่อยสลายเปรียบเทียบการคำนวณดังนี้

1. สัตว์ที่ใช้เป็นกระบือปลัก เจาะกระเพาะหมัก (fistulated swamp buffaloes)
2. ปรับสัตว์โดยใช้ฟางให้กินเต็มที่ (ad lib.) และให้อาหารข้นสูตร 14% CP ปรับสัตว์เป็นเวลา 7 วัน
3. นำอาหารที่ทดสอบมาวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี ตามวิธีมาตรฐานที่ได้อ้างอิงแล้ว
4. ทดสอบการย่อยสลายของอาหารโดยใช้ถุงในลอนขนาดรู 40 ไมครอน, 7 x 14 cm. ซึ่งตัวอย่างอาหารหยาบใส่ในถุงประมาณ 3-5 กรัมต่อถุง นำไปจุ่มในกระเพาะหมักแล้วจึงนำถุงออกมาที่ช่วงเวลา 0 , 2 , 4 , 6 , 12 , 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาล้างจนน้ำที่ล้างใส่ อบที่อุณหภูมิ 65°C ชั่งน้ำหนัก
5. นำเศษเหลือในถุงไปวิเคราะห์หาโปรตีนที่ตกค้างในถุง
6. นำข้อมูลจากการวิเคราะห์มาหาอัตราการย่อยสลาย ตามสมการ $p = a + b(1 - e^{-ct})$ ของ Orskov and McDonald (1979) ส่วนรายละเอียดของการทำ nylon bag และการคำนวณค่าต่าง ๆ มีอธิบายใน เมธา (2533)