บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ศึกษาการเสริมซาร์ซาโปนินต่อกระบวนการหมัก และการย่อยได้ในกระเพาะหมักของโคนม

3.1.1 การหาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนะของอาหารทดลอง

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในหญ้าแพงโกล่าและอาหารข้นที่เสริมด้วยซาร์ซาโปนินที่มีชื่อทางการค้าว่า DK sarsaponin 30® ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อินเทลโนเวชั่น จำกัด ซึ่งอาหารทดลอง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม (treatments) ดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 เสริมซาร์ซาโปนิน 5 กรัม/ตัว/วัน (T1)

กลุ่มที่ 2 เสริมซาร์ซาโปนิน 10 กรัม/ตัว/วัน (T2)

กลุ่มที่ 3 เสริมซาร์ซาโปนิน 15 กรัม/ตัว/วัน (T3)

โดย :

- วิเคราะห์หาโภชนะซึ่งประกอบด้วยวัตถุแห้ง (DM) อินทรียวัตถุ (OM) โปรตีนหยาบ (CP) ไขมัน (EE) เถ้า (Ash) ใช้การวิเคราะห์แบบ Proximate analysis (AOAC., 2000)

- วิเคราะห์องค์ประกอบส่วนที่เป็นโครงสร้างของพืชได้แก่ เยื่อใยหยาบ (CF) เยื่อใยที่ละลายได้ในด่าง (NDF) เยื่อใยที่ละลายได้ในกรด (ADF) และลิกนิน (ADL) ด้วยวิธี detergent method (Van Soest, 1982)

- คำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (NFE) จากสมการ 1

$$\%NFE = 100 - \%CP - \%EE - \%CF - \%Ash \quad (1)$$

และคำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย (NFC) จากสมการ 2

$$\%NFC = 100 - \%CP - \%EE - \%NDF - \%Ash \quad (2)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนม

3.1.2.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง × โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน โดยมีระดับสายเลือดของโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน 82.125-96.875 เปอร์เซ็นต์ อายุประมาณ 5-6 ปี จำนวน 3 ตัว ที่ทำการผ่าตัดเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักสอดท่อ rumen fistula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) และผ่าตัดเปิดทางเดินอาหารบริเวณ ลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) เพื่อทำการสอดท่อ T-shaped cannula (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532)

3.1.2.2 อาหารและการให้อาหาร

อาหารข้น แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง (treatments) ตามข้อ 3.1.1 ทำการผสมอาหารข้นเอง โดยให้มีความเข้มข้นของโภชนะ คือ โปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์

อาหารหยาบ ให้โคได้รับหญ้าแพงโกล่าสดเต็มที่

ให้อาหารหยาบและอาหารข้นแยกกัน โดยโคได้รับอาหารข้นวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 8.30 น. และ 16.30 น. โดยได้รับอาหารข้นตัวละ 2.0 กิโลกรัมต่อวัน โคทุกตัวอยู่ในคอกผูกยืนโรงที่มีรางน้ำแบบอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว มีน้ำสะอาดกินตลอดเวลา

3.1.2.3 วิธีการทดลอง

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะของโคนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (convention method) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) และการวัดปริมาณอาหารที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กด้วยการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) มีวิธีการดังนี้

3.1.2.3.1 การหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (Conventional method)

ในแต่ละคาบของการทดลอง (period) ใช้เวลาทั้งหมด 23 วัน โดย 14 วันแรกเป็นช่วงเวลาสำหรับให้โคและจุลินทรีย์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหาร (preliminary period) และช่วง 9 วันหลังเป็นช่วงเวลาเก็บข้อมูล (collection period) โดยวันที่ 15-19 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บมูล เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) บันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลที่ขับออกมา สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล (5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) โดยทำการเก็บมูลทุกครั้งที่โคถ่ายออกมาจนครบ 24 ชั่วโมงทำการชั่งน้ำหนักแล้วสุ่มเก็บตัวอย่าง 10 เปอร์เซ็นต์ นำมาแช่แข็งเพื่อเก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อย-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ปรากฏจากสมการ (บุญล้อม, 2540) ดังสมการ 3 และวันที่ 20-23 เป็นช่วงเวลาสำหรับเก็บตัวอย่างบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน} - \text{โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100 \quad (3)$$

ประเมินค่าโภชนะรวมที่ย่อยได้ (Total Digestible Nutrient; TDN) จากสมการ 4

$$\text{TDN} = \text{DCP} + \text{DNDF} + \text{DNFC} + 2.25 \times \text{DEE} \quad (4)$$

เมื่อ DCP = โปรตีนที่ย่อยได้

DNDF = เยื่อใยที่ละลายในด่างที่ย่อยได้

DNFC = คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้

DEE = ไขมันที่ย่อยได้

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation, NE_L) จากสมการที่เสนอโดย Kellner *et al.* (1984)

$$\text{GE (MJ/kg)} = 0.242\text{CP} + 0.0366\text{EE} + 0.0209\text{CF} + 0.0170\text{NFE} \quad (5)$$

$$\text{ME (MJ/kg)} = 0.0152\text{DCP} + 0.0342\text{DEE} + 0.0128\text{DCF} + 0.0159\text{DNFE} \quad (6)$$

$$NE_L\text{(MJ/kg)} = 0.4632 + 0.0024q \times \text{ME} \quad (7)$$

$$q = (\text{ME/GE}) \times 100$$

3.1.2.3.2 การวัดปริมาณอาหารที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กโดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโค ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าดัชนีวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็ก จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสม สำหรับสารบ่งชี้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ไททาเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพคือ มีสีขาว ไม่มีกลิ่นและรส คุณสมบัติทางเคมี คือ ไม่ละลายน้ำ และไม่สลายตัวเมื่อถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารของสัตว์

การวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลังเสร็จกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ โดยการเก็บตัวอย่างจากลำไส้-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เล็กส่วนต้นที่สอดท่อ T-shaped cannula ไว้เรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วัน คือ ตั้งแต่วันที่ 20-23 เพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมง โดยมีตารางเก็บตัวดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 5

ตาราง 5 ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กเพื่อวัดปริมาณอาหารที่เข้าสู่บริเวณลำไส้เล็กโดยวิธีใช้สารบ่งชี้

Day	Collection Time					
1	0900	1300	1700	2100	0100	0500
2	1000	1400	1800	2200	0200	0600
3	1100	1500	1900	2300	0300	0700
4	1200	1600	2000	2400	0400	0800

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณ 200 – 250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ในตัวอย่างต่อไป

วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ซึ่งทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง โดยสอดท่อลงไปเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ในส่วนล่างของกระเพาะหมัก (ventral sac) ประมาณ 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะเพื่อวัดค่าความเป็นกรด– ด่าง (pH) ในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ด้วยเครื่องวัด pH ยี่ห้อ Schott Gerate ปรับความเที่ยงตรงด้วยบัฟเฟอร์ 4 และ 7

วิเคราะห์หาค่าแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะหมักด้วยวิธี Conway method (Voigt und Steger, 1967) โดยเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) เพื่อทำการวัด ซึ่งจะทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง

วิเคราะห์หากรดไขมันระเหยได้ โดยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) หลังจากโคกินอาหารข้น 3 ชั่วโมง ประมาณ 250 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ปิดสนิท เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวจากกระเพาะหมัก เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยเครื่อง Shimudshu Gas chromatography (Ishler, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Crossover design (Robert, 1994) จำนวน 3 ช่วงการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

3.2 ศึกษาผลการเสริมซาร์ซาโปนินต่ออัตราการเจริญเติบโตของโคนมรุ่นเพศเมีย

3.2.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือโคนมรุ่นเพศเมียลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง×โฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยน จำนวน 12 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 163.50 กิโลกรัม อายุเฉลี่ย 1.5 ปี

3.2.2 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง ใช้โคทดลองจำนวน 12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ตามชนิดของอาหารทดลอง

กลุ่มที่ 1 เสริมซาร์ซาโปนินตัวละ 0 กรัม ต่อวัน (T1)

กลุ่มที่ 2 เสริมซาร์ซาโปนินในระดับที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 (T2)

- ก่อนเริ่มการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักโค ถ่ายพยาธิภายในและภายนอก เลี้ยงโคโดยปล่อยให้แทะเล็มในแปลงพืชอาหารสัตว์ แยกโคทดลองทั้งสองกลุ่มออกจากกันโดยการใช้ลวดไฟฟ้ากั้น
- ในการทดลองใช้เวลาทั้งหมด 104 วัน โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเตรียมการ 14 วัน เพื่อให้สัตว์คุ้นเคยกับอาหาร ส่วนระยะ 90 วันหลังจะเป็นระยะที่ทำการเก็บข้อมูล
- โคทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารข้นเสริมที่มีโปรตีนที่ระดับ 16 เปอร์เซ็นต์ โดยโคทดลองได้รับอาหารข้นวันละ 1 ครั้ง เวลา 08.30 น. ตัวละ 1.0 กิโลกรัมต่อวัน
- บันทึกน้ำหนักโคก่อนการทดลอง และหลังจากนั้นชั่งในสัปดาห์สุดท้ายของทุกๆ เดือน รวมทั้งหมด 3 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารข้นและหญ้าในแปลงเดือนละ 1 ครั้ง นำไปอบให้แห้งบันทึกค่าน้ำหนักแห้ง เก็บรวบรวมไว้เพื่อรอการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แบ่งโคนมออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 6 ตัวตามชนิดของอาหารทดลอง หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Student' s t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

3.2.4 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ฟาร์มทดลองหมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ประมาณ 12 เดือน ตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2552 ถึงเดือน สิงหาคม 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved