บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. กระบือเพศผู้ที่ได้รับการเจาะกระเพาะ (Rumen fistulated)
2. อาหารที่ใช้เลี้ยงกระบือ โดยใช้อาหารข้นสำเร็จรูปที่มีโปรตีน18 % และอาหารหยาบคือหญ้ารูซี่แห้ง
3. คอกทดลองแบบขังเดี่ยวพื้นปูนมีหลังคา มีรางอาหาร และอ่างน้ำดื่ม
4. ถุงไนล่อน (Nylon bag) ขนาด 8 x 14 เซนติเมตร ซึ่งมีรูเล็กขนาด 30-40 นาโนเมตร
5. ตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร
6. โถดูดความชื้น (Desiccators)
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. ตู้อบไอร้อน ยี่ห้อTest Equity Model FH5 Forced Air Oven
9. อุปกรณ์วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน
   9.1 ชุดย่อยโปรตีน F30180020 Velp 'Slim' Heating Digestor Type DK20S
   9.2 ชุดกลั่นโปรตีน Velp Model UDK 132 Semi-automatic Steam Distilling Unit
10. อุปกรณ์วิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF) ยี่ห้อ VELP Model FIWE 6
11. อุปกรณ์วิเคราะห์หาปริมาณ Acid Detergent Lignin, ADL
12. อุปกรณ์วิเคราะห์หาเถ้า (Ash Content) เตาเผา F81-106 - Muffle furnace Stuart S1203PID/D 2.97 1trs
13. อุปกรณ์ประเมินการย่อยได้ของโปรตีนโดยใช้ Three step technique
    13.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แบบเขย่า Forma Scientific Shaking Water Bath Model 2568
    13.2 ชุดย่อยโปรตีน F30180020 Velp 'Slim' Heating Digestor Type DK20S
    13.4 ชุดกลั่นโปรตีน Velp Model UDK 132 Semi-automatic Steam Distilling Unit

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ทำการศึกษาวิจัยถึงระดับการใช้ประโยชน์ของการใช้สารแทนนินในใบกระถิน เพื่อจับกับโปรตีนในอาหาร โดยการผสมส่วนของใบกระถิน ร่วมกับแหล่งโปรตีน และหาความสามารถในการย่อยได้ของโปรตีนหยาบในส่วนกระเพาะหมัก โดยเทคนิคการใช้ถุงไนล่อน (nylon-bag technique) จากนั้นทำการศึกษาการย่อยได้ของโปรตีนรวมในทางเดินอาหารส่วนล่าง (ลำไส้เล็ก) ของอาหารทั้ง 5 ชนิดโดยใช้แผนการทดลอง Randomized complete Block Design (RCBD) และคำนวณผลการวิเคราะห์ทางเคมีตามสมการของ Orskov, and McDonald (1979) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยวิธี F-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range test)

1. **ชนิดอาหารที่ใช้ทดลอง**

ทำการผสมส่วนของใบกระถิน ในรูปแห้งร่วมกับกากถั่วเหลือง บดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร โดยอาหารแต่ละสูตรมีอัตราส่วนของสารแทนนินและโปรตีนแตกต่างกันออกไปเพื่อศึกษาอัตราส่วนของสารแทนนินที่จะจับกับโปรตีนแท้ในอาหาร โดยระดับของสูตรอาหารมีดังนี้

ชนิดที่ 1	ใบกระถิน 100 ส่วน	กากถั่วเหลือง 0 ส่วน
ชนิดที่ 2	ใบกระถิน 0 ส่วน	กากถั่วเหลือง 100 ส่วน
ชนิดที่ 3	ใบกระถิน 25 ส่วน	กากถั่วเหลือง 75 ส่วน
ชนิดที่ 4	ใบกระถิน 50 ส่วน	กากถั่วเหลือง 50 ส่วน
ชนิดที่ 5	ใบกระถิน 75 ส่วน	กากถั่วเหลือง 25 ส่วน

ทำการสุ่มอาหารทั้ง 5 ชนิดประมาณ 0.5 กิโลกรัมมาทำการบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตรจากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างมาเพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นดังนี้

1. ระดับของปริมาณสารแทนนินในอาหารทั้ง 5 ชนิด
2. ระดับของโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method
3. วัตถุแห้ง (Dry matter) วิเคราะห์ตามวิธีการของ A.O.A.C. (1984)
4. วิเคราะห์เยื่อใยโดยใช้สารฟอก (Detergent Fiber Analysis) เพื่อหา NDF (neutral detergent fiber) ADF (acid detergent fiber) และ ADL (acid detergent lignin) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970)
5. วิเคราะห์หาเถ้า (Ash Content) ตามวิธีการของ A.O.A.C. (1984)

2. **สัตว์ทดลอง**

ใช้กระบือเพศผู้อายุ 2 ปีจำนวน 3 ตัว มีน้ำหนักตัวระหว่าง 220-248 กก.(เฉลี่ย 237.75± 12.76 กก.) ที่ได้รับการเจาะกระเพาะ (rumen fittulated) ก่อนการทดลองทำการถ่ายพยาธิ และฉีดไวตามิน AD_3E กระบือแต่ละตัวถูกขังเดี่ยวในคอกทดลองที่มีพื้นปูน มีหลังคาของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานี และมีการปรับสภาพร่างกายก่อนการทดลอง 2 สัปดาห์ เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของร่างกายกระบือ และในระหว่างการทดลองกระบือจะได้รับอาหารในระดับเพื่อการดำรงชีพ (maintenance) โดยได้รับอาหารข้นที่มีโปรตีน18 % ปริมาณ 1 กิโลกรัม/ตัว/วัน และให้หญ้าแห้ง (หญ้ารูซี่) 2 กิโลกรัม/ตัว/วัน เป็นอาหารหยาบ โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งคือ เวลา 08.00 น.และ16.00 น.โดยมีน้ำที่สะอาดให้กินตลอดเวลา

3. **วิธีการทดลอง**

3.1 จัดเตรียมถุงไนล่อน (nylon bag) ขนาด 8 x 14 เซนติเมตร ซึ่งมีรูเล็กขนาด 30-40 นาโนเมตร จำนวน 180 ถุง (5 Treatments x 2 replication x 6 time x 3 animal) โดยทำการอบแห้งและชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของถุงตามวิธีการของ Orskov, and McDonal (1979)

3.2 บดอาหารแต่ละชนิดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณ 5 กรัม (air dry basis) จากนั้นนำใส่ลงในถุงไนล่อนมัดปากถุงด้วยเชือกให้แน่น ทำเช่นนี้กับอาหารทั้ง 5 ชนิด

3.3 ศึกษาการย่อยได้ในถุงไนล่อนใช้แผนการทดลอง Randomized complete Block Design (RCBD) โดยบ่มถุงไนล่อนลงในกระเพาะรูเมนของกระบือที่เจาะกระเพาะ จำนวน 3 ตัวในช่วง 6 เวลา ตามชนิดอาหารทดลองทั้ง 5 ชนิด โดยใช้ช่วงเวลาที่ 0, 2, 4, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงในกระเพาะรูเมน โดยมีแผนการบ่ม ดังแสดงในตาราง 11

ตำแหน่งที่เหมาะสมในการนำถุงไนล่อนบ่มในกระเพาะรูเมนคือลึกประมาณ 50 เซนติเมตร จากฝา cannula โดยให้อยู่ในส่วนล่างของกระเพาะรูเมน (ventral sac of the rumen) เพราะเป็นตำแหน่งที่ถุงไนล่อนสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระทั้งในส่วนที่เป็นของแข็ง (solid phase) และของเหลว (liquid phase)

ตาราง 11 แผนการบ่มถุงไนล่อนในกระเพาะรูเมน

วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
01.00	01.00	01.00
02.00	02.00	02.00
03.00	03.00	03.00
04.00	04.00	04.00
05.00	05.00	05.00*(4 ชม.)
06.00	06.00	06.00
07.00	07.00	07.00*(2 ชม.)
08.00	08.00	08.00
09.00*(48 ชม.)	09.00*(24 ชม.)	09.00** เก็บออก
10.00	10.00	10.00
11.00	11.00	11.00
12.00	12.00	12.00
13.00	13.00	13.00
14.00	14.00	14.00
15.00	15.00	15.00
16.00	16.00	16.00
17.00	17.00	17.00
18.00	18.00	18.00
19.00	19.00	19.00
20.00	20.00	20.00
21.00	21.00*(12 ชม.)	21.00
22.00	22.00	22.00
23.00	23.00	23.00
24.00	24.00	24.00

* นำถุงลงบ่มในกระเพาะรูเมนตามเวลาที่ต้องการคือ 48, 24,12,4 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ

** นำถุงทั้งหมดออกจากกระเพาะรูเมนพร้อมกัน

ตัวอย่างถุงไนล่อนที่เตรียมสำหรับ 0 ชั่วโมง คือไม่ต้องแช่ในกระเพาะรูเมน จำนวน 5 treatment x 2 replication เท่ากับ 10 ถุงนำมาแช่น้ำประมาณ 1 ชั่วโมงโดยทำในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับการนำถุงทั้งหมดออกจากกระเพาะรูเมน เพื่อจะได้นำเข้าเครื่องซักผ้าพร้อมกันค่าของตัวอย่างอาหารที่สูญหายไปจากถุงชุดนี้คือค่า washing loss

3.4 นำถุงไนล่อนที่เก็บออกจากกระเพาะรูเมนเมื่อครบตามกำหนดเวลามาทำการล้างน้ำให้สะอาดโดยใช้เครื่องซักผ้าระบบอัตโนมัติ โดยใช้รอบการหมุนของมอเตอร์ระดับต่ำที่สุดและเปิดน้ำให้ไหลล้นตลอดเวลาประมาณ 15 นาที

3.5 นำถุงไนล่อนไปทำการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.6 นำถุงไนล่อนออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (dessicator) แล้วชั่งน้ำหนักถุงไนล่อนและตัวอย่างอาหารที่เหลือ เพื่อนำค่ามาคำนวณหาการย่อยได้ของวัตถุแห้ง

3.7 ทำการรวบรวมส่วนอาหารแต่ละชนิดที่เหลือจากการย่อยจากถุง ในกระบือทุกตัวที่เวลาเดียวกันเข้าวิเคราะห์โปรตีนหยาบวิธีของวิธีการของ A.O.A.C. (1984)

3.8 คำนวณการย่อยได้ของวัตถุแห้ง และการย่อยได้ของโปรตีนหยาบตามหนังสือของเมธา (2533) ดังสมการที่ 1 และ 2

$$\text{การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (\%)} = 100 - \frac{(\text{นน.ถุงพร้อมเศษเหลือ} - \text{นน.ถุง})}{\text{นน.ตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

การย่อยได้ของโปรตีนหยาบ (%)

$$100 - \frac{(\text{โปรตีนที่หายไปหลังการแช่ในรูเมน})}{\text{โปรตีนในตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 2}$$

3.9 จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของวัตถุแห้งและโปรตีนหยาบที่คำนวณได้ตามระยะเวลาที่จุ่มในรูเมน นำข้อมูลเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Effective degradability) ที่ outflow rate 0.05 ตามสมการเอ็กซ์โปเนนเชียล ของ Orskov, and McDonald (1979) ดังสมการที่ 3

$P = a+b\ (1-e^{-ct})$ สมการที่ 3

โดยที่ค่า a, b และ c เป็นค่าคงที่

P เป็นค่าของวัตถุที่แตกตัวหรือย่อยสลายในถุงไนล่อนที่เวลา t

a เป็นค่าการแตกตัวของวัตถุที่เวลา 0 ชั่วโมง

b เป็นค่าการแตกตัวได้สูงสุดของวัตถุในกระเพาะรูเมน

e เป็นอัตราการแตกตัวของวัตถุในส่วนของ b โดยคำนวณจากลักษณะของเส้นกราฟ

ส่วนอัตราการชะล้างโดยน้ำ (washing loss) และค่าคงที่ของอัตราการย่อยสลาย (degradability rate constant) ของวัตถุแห้ง และโปรตีนหยาบโดยใช้ IFRU fit curve procedure

3.10 ทำการแบ่งอาหารที่เหลือจากการย่อยในกระเพาะรูเมนอีกส่วนหนึ่งในชั่วโมงที่ 12 ของการบ่มในรูเมนจากทุกซ้ำมารวมกัน เนื่องจากพบว่าค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งค่อนข้างคงที่แล้ว และมีปริมาณตัวอย่างอาหารเหลือมากพอ มาทำการศึกษาการย่อยได้ในทางเดินอาหารส่วนล่าง โดยเทคนิคในห้องปฏิบัติการ (*In Vitro*) โดยการประเมินการย่อยได้ของโปรตีนในลำไส้เล็กโดยใช้ three step technique โดยใช้เอมไซม์เปปซิน และแพนครีเอทินย่อย และนำมาวิเคราะห์โปรตีนรวม (crude protein) ตามวิธีการของ A.O.A.C. (1984) จากนั้นทำการคำนวณการย่อยได้ของโปรตีนในลำไส้เล็ก ดังนี้

3.10.1 การย่อยได้ของกระเพาะแท้และลำไส้เล็ก (Postruminal CP digestibility) % คำนวณได้จากสมการที่ 4

$$\frac{\text{โปรตีนเริ่มต้น} - \text{โปรตีนที่เหลือ}}{\text{โปรตีนเริ่มต้น}} \times 100$$ สมการที่ 4

3.10.2 สัดส่วนของการย่อยได้ของโปรตีนในลำไส้เล็ก (Ratio of CP digestibility in intestine) % คำนวณได้จากสมการที่ 5

$$\text{การย่อยได้ของโปรตีนหยาบทั้งหมด (\%)} - \text{การย่อยได้ของโปรตีนรวมในรูเมน}$$ สมการที่ 5

3.10.3 การย่อยได้ทั้งหมด (Total digestibility) % คำนวณได้จากสมการที่ 6

$$\frac{\text{โปรตีนเริ่มต้นในถุงไนล่อน} - \text{โปรตีนที่เหลือในหลอดทดลอง}}{\text{โปรตีนเริ่มต้นในถุงไนล่อน}} \times 100$$ สมการที่ 6

3.10.4 **โปรตีนที่ไม่ถูกย่อย (Undigested CP) % โดยคำนวณจากสมการที่ 7**

100 - % การย่อยได้ของโปรตีนทั้งหมด สมการที่ 7

4. **วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามการจัดการทดลองแบบ RCBD โดยวิธีการทางสถิติด้วย analysis of variance (ANOVA) โดยวิธี F – test และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการทางเคมี คณะเทคโนโลยีและการจัดการมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี
2. ห้องปฏิบัติการทางเคมี คณะสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี
3. ห้องปฏิบัติการทางเคมี สถาบันวิจัย และฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลสกลนคร
4. ใช้สัตว์ทดลอง (กระบือ) และคอกทดลองของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานี ต.มะลวน อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัยใช้ระยะเวลา 12 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2549 และสิ้นสุดโครงการเดือนกุมภาพันธ์ 2550