บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ขั้นตอนที่ 1 ปลูกหญ้าในการวิจัย เตรียมอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องคือ พื้นที่ทำการวิจัย 3 แห่งคือ

1) พื้นที่แปลงทดลอง มี 3 แห่งคือ

(1) แปลงทดลองที่ 1) แปลงทดลองในสวนลำไยแม่เหียะ

(2) แปลงทดลองที่ 2) แปลงทดลองแม่เหียะ

(3) แปลงทดลองที่ 3) แปลงทดลองในสวนลำไยสันทราย

2) พันธุ์ที่ใช้ปลูกมีดังนี้

(1) ท่อนพันธุ์ จำนวน 2 พันธุ์ คือ

- หญ้าเนเปียร์ (*Pennesetum purpureum*)
- หญ้าเฮมิลกินนี (*Panicum maximum* cv. Hamil)

(2) เมล็ดพันธุ์

- หญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* cv.TD58)
- หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*)
- หญ้าอะตราตัม (*Paspalum atratum* BRA 9610)
- หญ้าอุบลพาสพาลัม (*Paspalum atratum* Swallen)

3) ปุ๋ยคอกจากมูลโคนม

4) ปุ๋ยยูเรีย (46 – 0 – 0)

5) อุปกรณ์ในการให้น้ำ

6) อุปกรณ์ในการตัดหญ้า

7) เครื่องชั่ง ตู้อบลมร้อน เครื่องบดตัวอย่างสำหรับห้องปฏิบัติการ

3.1.2 ขั้นตอนที่ 2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1) วิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีนรวม ไขมัน และเถ้า โดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984)

2) วิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืชโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest (1970)

3.1.3 ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยใช้ถุงไนลอน (*in sacco* degradation characteristics)

1) สัตว์ทดลอง ใช้โคนมเพศเมียลูกผสมโฮลสไตน์ – ฟรีเชียน กับโคนมลูกผสมพื้นเมือง อายุ 4 ปี น้ำหนักประมาณ 400 – 470 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว เลี้ยงแบบยืนโรงในซองขังเดี่ยว โรงเรือนติดตาข่ายกันแมลงโดยรอบ มีระบบอ่างน้ำดื่มแบบอัตโนมัติ โคทุกตัวได้รับการผ่าตัดฝังท่อ (rumen fistula) ที่มีฝาปิดเปิดบริเวณกระเพาะรูเมนด้านซ้าย ทำด้วยซิลิโคน (silicone)

2) อาหารและการให้อาหาร โคทดลองจะได้รับอาหารข้นและอาหารหยาบและมีน้ำให้ดื่มแบบอัตโนมัติตลอดเวลา โดยที่โคทดลองจะได้รับอาหารข้นวันละ 3 กิโลกรัม ใช้วิธีโรยลงทับอาหารหยาบ เพื่อให้สภาพภายในกระเพาะรูเมนเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด โดยเฉพาะความเป็นกรด – ด่าง แบ่งอาหารให้กินวันละ 2 เวลา ในปริมาณเท่ากัน ให้มีระยะเวลาในการให้อาหารห่างกัน 8 ชั่วโมง คือ เวลา 08.00 น และเวลา 16.00 น. อาหารข้นมีโปรตีนประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบของอาหารข้น สำหรับโคทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ปริมาณส่วนประกอบของอาหารข้นที่โคทดลองได้รับ

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
กากทานตะวัน	35
ข้าวโพดบด	30
กากถั่วเหลือง	21
รำละเอียด	10
ไดแคลเซี่ยมฟอสเฟต	3
เกลือ	1

3) อุปกรณ์

(1) ถุงไนลอนที่ใช้ในการทดลอง เป็นถุงจากประเทศอังกฤษที่มีการจำหน่ายเป็นการค้า โดยมีขนาด 70 x 150 มิลลิเมตร มีขนาดรู (pore size) 20 – 40 µm ก่อนทำการทดลองจะแช่น้ำ ทำความสะอาด และนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

(2) สายยางพลาสติก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 10 มิลลิเมตร ยาว 30 เซนติเมตร ที่เจาะช่องไว้เป็นระยะ ๆ ประมาณ 9 ช่อง

(3) เชือกไนลอนและยางรัด

(4) เครื่องชั่ง

(5) ตู้อบและโถดูดความชื้น

(6) เครื่องซักผ้าแบบอัตโนมัติมีฝาเปิดด้านหน้า

4) ตัวอย่างอาหารทดลอง

ตัวอย่างอาหารทดลองเป็นตัวอย่างหญ้าจำนวน 6 พันธุ์ ในพื้นที่ 3 แปลงทดลอง รวมเป็น 18 ตัวอย่าง ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ หญ้าเฮมิลกินนี หญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าอะตราตัม และหญ้าอุบลพาสพาลัม

3.1.4 ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาการย่อยได้โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gas production technique) ใช้อุปกรณ์ในการทดลองดังนี้

1) เครื่องมือ

(1) อ่างน้ำอุ่น (water bath) ที่สามารถปรับอุณหภูมิให้คงที่ที่ 39 ± 0.5 องศาเซลเซียส ขนาด 63 x 87 x 59 เซนติเมตร

(2) จานหมุนหรือล้อหมุน (rotator) ประกอบด้วยจานกลม หรือล้อทำด้วยแผ่นพลาสติกแข็ง 2 จาน เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร วางห่างกัน 12 เซนติเมตร จานหรือล้อนี้เจาะรูไว้ 57 รู แต่ละรูมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 38 มิลลิเมตร เป็นช่องสำหรับเสียบหลอดตัวอย่าง (piston pipettes) ที่ฐานของจานมีสายพานติดมอเตอร์ไฟฟ้า ให้จานหมุนได้ด้วยความเร็ว 1 – 2 รอบต่อนาที

(3) หลอดใส่ตัวอย่างอาหารหรือไซริงก์ (piston pipettes หรือ glass syringes) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 36 มิลลิเมตร ภายใน 32 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตร และมีความจุ 150 มิลลิเมตร มีขีดบอกปริมาตรถึง 100 มิลลิเมตร ปลายหลอดติดกับสายยาง (silicone tube) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร และมีคลิปหนีบ (clip) เป็นพลาสติกที่สามารถเปิด-ปิดให้แก๊สออกได้

(4) อุปกรณ์สำหรับเก็บของเหลว จากกระเพาะรูเมนของโคนมทดลอง ที่ได้รับการเจาะกระเพาะไว้แล้ว โดยดัดแปลงจากสูบลมจักรยาน ภาชนะสำหรับใส่ของเหลวจากกระเพาะรูเมน (flask) มีความจุ 1 ลิตร มีจุกยางสำหรับปิด หรือใช้กรวยขนาดใหญ่และผ้าขาวบาง 2 ชั้น สำหรับกรองในกรณีที่ไม่ใช้สูบลมจักรยาน

(5) ปีเปตอัตโนมัติ (semi - autopipett) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่สามารถอ่านได้ละเอียดได้ถึง 1 มิลลิลิตร และปีเปต ขนาด 0.1, 0.5, 1 มิลลิลิตร

(6) ขวดแก้วขนาดความจุประมาณ 2,000 มิลลิลิตร สำหรับใส่สารละลายบัฟเฟอร์

(7) เครื่องกวนสารละลายระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

(8) เทอร์โมมิเตอร์

(9) พีเอชมิเตอร์ (pH meter)

(10) ถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

2) สารเคมี

การเตรียม rumen liquor buffer มีส่วนประกอบดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ต่อ 1 หลอด
1. น้ำ	10
2. Buffer solution	5
3. Macro mineral solution	5
4. Resazurine solution	0.025
5. Micro mineral solution	0.0025
6. Reduction solution	1
7. Rumen fluid	10

โดยที่ส่วนประกอบของสารละลายแต่ละรายการ มีสารเคมีเป็นส่วนประกอบดังนี้

(1) Buffer solution ประกอบด้วย

NH_4HCO_3 4.0 กรัม

$NaHCO_3$ 35.0 กรัม

(2) Macro mineral solution

Na_4HPO_3 (anhydrous) 5.7 กรัม

KH_2O_4 (anhydrous) 6.2 กรัม

$MnSO_4 . 7H_2O$ 0.6 กรัม

(3) Resazurine solution 0.1 % (W/V) เตรียมโดยการชั่ง resazurine 100 mg. ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(4) Micro mineral solution ประกอบด้วย

$CaCl_2 . 2H_2O$ 13.2 กรัม

$MnCl_2 . 4H_2O$ 10.0 กรัม

$CoCl_2 . 6H_2O$ 1.0 กรัม

$FeCl_3 . 6H_2O$	0.8 กรัม

(5) Reduction solution ประกอบด้วย

NaOH 1N	2.0 มิลลิลิตร
$Na_2S. 9H_2O$	312.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	47.5 มิลลิลิตร

สำหรับ Reduction solution ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำและเตรียมก่อนเก็บ rumen fluid เพียงเล็กน้อย ส่วนสารละลายอื่น ๆ สามารถเตรียมไว้ในขวดสีชาหรือใช้กระดาษดีบุกหุ้ม และเก็บไว้ในตู้เย็นได้ ซึ่งระยะเวลาในการเก็บไม่ควรเกิน 3 เดือน

3) สัตว์ทดลอง

ใช้โคนมเพศเมียลูกผสมโฮลสไตน์ – ฟรีเชียน กับโคนมลูกผสมพื้นเมืองรายละเอียด เช่นเดียวกับ สัตว์ทดลองในข้อ 1) ขั้นตอนที่ 3

4) ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างหญ้าจำนวน 6 พันธุ์ จากพื้นที่ 3 แปลงทดลองรวมเป็น 18 ตัวอย่าง ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ หญ้าเฮมิลกินนี หญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าอะตราตัม และหญ้าอุบลพาสพาลัม

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การปลูกหญ้าในการทดลอง 3 พื้นที่แปลงทดลอง คือ แปลงทดลองที่ 1) แปลงทดลองในสวนลำไยแม่เหียะ แปลงทดลองที่ 2) แปลงทดลองแม่เหียะ และแปลงทดลองที่ 3) แปลงทดลองในสวนลำไยสันทราย โดยที่แปลงทดลองที่ 1) แปลงทดลองในสวนลำไยแม่เหียะ และแปลงทดลองที่ 3) แปลงทดลองในสวนลำไยสันทราย เป็นแปลงทดลองที่อยู่ในสวนลำไย มีสภาพร่มเงา ส่วนแปลงทดลองที่ 2) แปลงทดลองแม่เหียะ อยู่กลางแจ้งซึ่งสามารถรับแสงแดดได้ตลอดวัน ในแต่ละแปลงทดลองจะปลูกหญ้าจำนวน 6 พันธุ์ ปลูกพันธุ์ละ 3 แปลง โดยวางแผนการทดลองแบบ Split – Plot in Randomized Complete Block Design โดยใช้พื้นที่แปลงทดลองเป็น Main – Plot และพันธุ์เป็น Sub – Plots มี 3 ซ้ำ (Steel and Torrie, 1960) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s New Multiple Rang Test (Little and Hills, 1972) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT 1991.

1) การเก็บตัวอย่างดิน สุ่มเก็บตัวอย่างดินก่อนและหลังปลูก ในแต่ละแปลงนำมาผึ่งให้แห้ง เก็บเศษวัสดุอื่น ๆ ที่เจือปนออกไป บดให้ละเอียด ผ่านตะแกรงอย่างละเอียด และเก็บตัวอย่างดินแปลงละ 500 กรัม รวมเป็น 3 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางเคมีของดิน ซึ่งวิเคราะห์โดย ฝ่ายวิเคราะห์ดิน สำนักพัฒนาที่ดินเขต 6 ลำปาง

2) การเตรียมแปลง

(1) ทำการไถดะ จำนวน 1 ครั้ง ผึ่งแดดไว้ให้วัชพืชตาย ประมาณ 15 วัน จากนั้นไถพรวน อีก 1 ครั้ง เก็บเศษวัชพืชออกจากแปลง

(2) เตรียมแปลงสำหรับปลูกหญ้า และย่อยดินให้ละเอียดพร้อมปลูก มีการเตรียมแปลงคือ

(2.1) แปลงทดลองที่ 1) เตรียมแปลงขนาด 3 x 5 เมตร

(2.2) แปลงทดลองที่ 2) เตรียมแปลงขนาด 3 x 5 เมตร

(2.3) แปลงทดลองที่ 3) เตรียมแปลงขนาด 2.5 x 8 เมตร

3) ใส่ปุ๋ยคอกรองพื้นอัตรา จำนวน 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ และใส่ปุ๋ยยูเรีย (46 – 0 –0) ใส่หลังตัดวัดผลผลิตหญ้าทุกครั้งในอัตรา 64 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่

4) การปลูก ในแต่ละพื้นที่แปลงทดลองจะปลูกหญ้า 18 แปลง หญ้าพันธุ์ละ 3 แปลง โดยใช้พันธุ์หญ้าจำนวน 6 พันธุ์ คือ

(1) หญ้าเนเปียร์ (*Pennesetum purpureum*) ใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ซึ่งมีปล้องไม่ต่ำกว่า 2 ปล้อง แต่ละปล้องยาวเฉลี่ยประมาณ 14 เซนติเมตร ใช้ท่อนพันธุ์ 2 ท่อนต่อหลุม ระยะปลูก 50 x 50 เซนติเมตร (ทิพาและคณะ, 2536)

(2) หญ้าเฮมิลกินนี (*Panicum maximum* cv. Hamil) ใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ซึ่งมีปล้องไม่ต่ำกว่า 2 ปล้อง แต่ละปล้องยาวเฉลี่ยประมาณ 14 เซนติเมตร ใช้ท่อนพันธุ์ 2 ท่อนต่อหลุม ระยะปลูก 50 x 50 เซนติเมตร

(3) หญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* cv.TD58) ปลูกโดยใช้เมล็ดหว่านอัตรา 2 กิโลกรัมต่อไร่

(4) หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) ปลูกโดยใช้เมล็ดหว่านอัตรา 2 กิโลกรัมต่อไร่

(5) หญ้าอะตราตัม (*Paspalum atratum* BRA9610) ปลูกโดยใช้เมล็ดหว่านอัตรา 2 กิโลกรัมต่อไร่

(6) หญ้าอุบลพาสพาลัม (*Paspalum atratum* Swallen) ปลูกโดยใช้เมล็ดอัตรา 2 กิโลกรัมต่อไร่

5) การดูแล

(1) การปลูกซ่อม ทำการปลูกซ่อมแซมหญ้าในส่วนที่เจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอหรือกรณีที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์ถ้ามีการตาย ก็ปลูกซ่อมด้วยเช่นกัน

(2) การกำจัดวัชพืช ทำการกำจัดวัชพืชภายหลังปลูกประมาณ 3 สัปดาห์ และเท่าที่จำเป็น

6) การตัดหญ้าเพื่อเก็บวัดผลผลิต ในแต่ละแปลงจะเว้นขอบแปลงด้านละ 0.5 เมตร และทำการตัดหญ้าในพื้นที่ที่เหลือทั้งหมด หลังจากตัดหญ้าแต่ละแปลงจะบันทึกน้ำหนักสดไว้ทั้งหมด ส่วนหญ้าแต่ละพันธุ์จะมีอายุการตัดดังนี้

(1) หญ้าเนเปียร์ อายุการตัดครั้งแรกอายุ 70 วัน และตัดครั้งต่อๆไป ทุก 45 วัน ตัดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร

(2) หญ้าเฮมิลกินนี อายุการตัดครั้งแรกอายุ 70 วัน และตัดครั้งต่อๆไป ทุก 45 วัน ตัดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร

(3) หญ้ากินนีสีม่วง อายุการตัดครั้งแรกอายุ 70 วัน และตัดครั้งต่อๆไป ทุก 45 วัน ตัดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร (ศศิธรและคณะ, 2536ก, 2536ข, 2539)

(4) หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) อายุการตัดครั้งแรกอายุ 70 วัน และตัดครั้งต่อๆไป ทุก 45 วัน ตัดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร (ชิตและคณะ, 2535)

(5) หญ้าอะตราตัม (*Paspalum atratum* BRA9610) อายุการตัดครั้งแรกอายุ 70 วัน และตัดครั้งต่อๆไป ทุก 45 วัน ตัดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร

(6) หญ้าอุบลพาสพาลัม (*Paspalum atratum* Swallen) อายุการตัดครั้งแรกอายุ 70 วัน และตัดครั้งต่อๆไป ทุก 45 วัน ตัดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร

การตัดหญ้าครั้งแรกเมื่ออายุ 70 วัน เป็นการตัดเพื่อปรับสภาพของหญ้า ให้มีความแปรปรวนน้อยที่สุด จากความแตกต่างของการใช้ท่อนพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ปลูก

7) ทำการสุ่มหญ้าที่ตัดแต่ละครั้ง ในแต่ละแปลง ประมาณ 1,000 กรัม ชั่งน้ำหนักสด นำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักอีกครั้ง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยทำการบดตัวอย่างผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 1 มิลลิเมตร และบดตัวอย่างผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 2 มิลลิเมตร เพื่อใช้ใน (1) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและใช้ในการศึกษาการย่อยได้โดยวิธีวัดปริมาณแก๊ส (2) ใช้ในการศึกษาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนลอนตามลำดับ

8) การวัดปริมาณแสง ทำการวัดแสงทุกแปลงวัด 6 ครั้งต่อวัน โดยวัดปริมาณแสงแดดที่ตกกระทบลงสู่แปลง วัดในแปลงทดลองที่ 1) แปลงทดลองในสวนลำไยแม่เหียะ และแปลงทดลองที่ 3) แปลงทดลองในสวนลำไยสันทราย แล้วคำนวณพื้นที่ที่แสงตกกระทบแปลงโดยประเมินเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แต่ละแปลง ส่วนแปลงทดลองที่ 2) แปลงทดลองแม่เหียะเป็นแปลงที่อยู่กลางแจ้งกำหนดให้แสงที่ตกกระทบ ลงสู่แปลงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 ขั้นตอนที่ 2 ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1) วิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีนรวม ไขมัน และเถ้า โดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984)

2) วิเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของพืชโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970)

3.2.3 ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาทดลองหาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนลอน(*in sacco*)

1) ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือตัวอย่างหญ้า 6 พันธุ์ ในพื้นที่ 3 แปลงทดลอง รวมเป็น 18 ตัวอย่าง ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ หญ้าเฮมิลกินนี หญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าอะตราตัม และหญ้าอุบลพาสพาลัม ซึ่งได้ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วบดผ่านตะแกรงขนาดที่มีรูขนาด 2 มิลลิเมตร

2) ชั่งน้ำหนักถุง (W_1)

3) ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม (W_2) ใส่ในถุงไนลอน

4) ร้อยถุงไนลอนติดกับสายยางพลาสติก แล้วใช้ยางรัดมัดให้แน่น

5) นำถุงไนลอนไปแช่ในกระเพาะรูเมน ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ คือ 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

6) หลังครบกำหนดแล้ว นำถุงไนลอนไปล้างในน้ำสะอาด เพื่อให้อาหารในกระเพาะรูเมน ที่ติดมากับถุงไนลอนออกไป

7) เตรียมถุงไนลอนอีก 1 ชุด (2 ซ้ำ) แช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง และซักด้วยเครื่องซักผ้าอัตโนมัติแบบมีฝาเปิดด้านหน้า และนำไปอบพร้อมถุงไนลอน ในข้อ 6) เพื่อหาค่า washing loss

8) นำถุงไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 48 ชั่วโมง (Ørskov *et al*., 1988) และแยกถุงออกจากสายยาง แล้วนำถุงและตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักที่เหลือ (W_3) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งที่หายไป (% Dry matter disappearance)

$$\% \text{ Dry matter disappearance} = \frac{(W_1 + W_2) - W_3}{W_2} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุง

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอาหารเริ่มต้น

W_3 = น้ำหนักถุง + ตัวอย่างอาหารหลังอบ

9) การคำนวณค่าปริมาณการย่อยสลายของตัวอย่าง

นำค่า % Dry matter disappearance ที่ชั่วโมงต่าง ๆ ไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยสลาย โดยใช้สมการจาก Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

$$P = a + b\,(1 - e^{-ct})$$

เมื่อ P = โภชนะที่หายไปที่เวลา t (degradation at time t)

a = ส่วนที่ละลายได้ (immediately soluble material)

b = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but fermentable material)

c = อัตราการย่อยสลาย (degradation rate)

10) การคำนวณวัตถุแห้งที่กินได้ (dry matter intake, DMI), ปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ(digestible dry matter intake : DDMI), และอัตราการเจริญเติบโต (growth rate)

เมื่อใช้โปรแกรม NEWAY คำนวณค่า A, B และ c แล้วนำค่าที่ได้มาทำนายวัตถุแห้งที่กินได้ (DMI), วัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ(DDMI) และอัตราการเจริญเติบโต(Growth rate) โดยใช้สมการที่ Shem *et al.* (1995) ได้เสนอไว้คือ

$$\text{DMI (kg/day)} = -8.286 + 0.266A + 0.102B + 17.696c \quad (r = 0.90)$$

$$\text{DDMI (kg/day)} = -7.609 + 0.219A + 0.080B + 24.191c \quad (r = 0.93)$$

$$\text{Growth rate (kg/day)} = -0.649 + 0.017A + 0.006B + 3.87c \quad (r = 0.93)$$

11) สำหรับการคำนวณค่าดัชนีบ่งชี้ (Index value)ได้คำนวณตามวิธีที่แนะนำโดย Ørskov and Ryle (1990) คือ

$$\text{Index value} = A + \frac{X_2 B}{X_1} + \frac{X_3 c}{X_1}$$

$$\text{Index value} = A + 0.38A + 66.6c \text{ (Shem } et\ al.\text{,1995)}$$

3.2.4. ขั้นตอนที่ 4 การหาการย่อยได้แบบ *in vitro* โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (Gas production technique)

1) การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดผ่านตะแกรงที่มีรู ขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในไซริงก์แก้ว (syringe) ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีขีดบอกปริมาตรอยู่ข้างหลอด ปลายหลอดไม่มีเข็ม แต่มีสายยางสั้น ๆ พร้อมคลิปปิด - เปิด ใช้วาสลีนทาแกน (piston) ให้ทั่วซึ่งการทาวาสลีนเพื่อป้องกันไม่ให้แกนฝืด และป้องกันการรั่วไหลของแก๊สที่เกิดขึ้นในระหว่างการ incubate โดยก่อนใส่ตัวอย่างอาหารต้องมีการทดสอบไซริงก์และแกนดัน แต่ละคู่ให้มีขนาดพอดีกัน ระวังอย่าให้แน่นหรือหลวมจนเกินไป เพราะถ้าแน่นเกินไปจะทำให้เกิดปัญหาหลอดไซริงก์ฝืด ดึงแกนดันไม่ออก หรือหากหลอดหลวมเกินไป จะทำให้ของเหลวภายในไซริงก์ไหลซึมออกมา มีผลทำให้ค่าที่ได้ผิดพลาดไป ใช้ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (replication) อุ่นไซริงก์ที่ใส่ตัวอย่างอาหารไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การเตรียมหลอด syringe

หลอดที่ 1 – 3 สำหรับทำ blank

หลอดที่ 4 - 6 สำหรับตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน

หลอดที่ 7 - 9 สำหรับตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน

หลอดที่เหลือเป็นของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

หลอด syringe 3 หลอดสุดท้าย สำหรับทำ blank

(ตัวอย่างมาตรฐานของอาหารหยาบและอาหารข้นได้รับความอนุเคราะห์มาจากมหาวิทยาลัย Hohenheim ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน)

2) ผสมสารละลายหมายเลข 1 – 5 (ข้อ 2) สารเคมี) ก่อนที่จะเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน แช่ภาชนะใส่สารละลายในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส คนด้วย magnetic stirrer พร้อมทั้งจุ่มสายยางที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ลงในสารละลายตลอดเวลา เพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) จากนั้นเติม reduction solution ลงไป สีของสารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู และไม่มีสี ตามลำดับ แล้วจึงค่อยเติม rumen liquor ที่ได้กรองเอาอาหารหยาบออกแล้วลงไป

3) การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนและการ incubated กับตัวอย่าง

(1) การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ทำการเก็บก่อนที่จะให้สัตว์กินอาหารตอนเช้า ขวดที่ใช้เก็บควรมีขนาด 1 ลิตร พร้อมจุกยางปิด โดยที่ขวดที่นำไปเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนต้องเป็นสภาพไร้ออกซิเจน โดยใช้แก๊สคาร์บอนไซด์เป่าลงไป และลวกขวดด้วยน้ำอุ่น ปั๊มน้ำจากกระเพาะรูเมน หรืออาจใช้วิธีนำอาหารจากกระเพาะรูเมนออกมาบีบผ่านผ้ากรองตาห่าง ลงไปในขวด เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ให้เต็มขวดเพื่อไม่ให้มีออกซิเจนปิดฝาอย่าให้ออกซิเจนเข้า (การเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนควรเก็บจากโคทดลองจำนวน 4 ตัว เพื่อลดความแปรปรวนอันเกิดจากโคแต่ละตัว) ถ้าสัตว์เจาะกระเพาะอยู่ห่างจากห้องปฏิบัติการควรใช้กระติกแช่ เพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิ

(2) เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ แช่ขวดที่เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อไล่ออกซิเจนออกตลอดเวลา ทำการผสมกับสารละลายที่เตรียมไว้ (ในข้อที่ 2) ตามปริมาณที่ต้องการ ซึ่งสีของสารละลายที่เตรียมไว้ก่อนที่จะใส่ของเหลวจากกระเพาะรูเมนจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีฟ้าเข้มเป็นสีชมพู และไม่มีสีตามลำดับ แสดงว่าเกิดขบวนการ reduction อย่างสมบูรณ์

(3) เติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนที่กรองไว้แล้ว ใส่ใน woufle bottle ขนาด 2 ลิตร ที่วางไว้ในอ่างน้ำอุ่นที่ปรับอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส คนให้เข้ากันตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer และในขณะเดียวกันต้องผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ลงในสารละลายตลอดเวลา (เนื่องจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง จะถูกนำไปใช้ในขบวนการ reduction) โดยจุ่มสายยางลงในขวด ก่อนเติมของเหลวจากกระเพาะรูเมน ลงในสารละลายให้ตรวจอุณหภูมิอีกครั้งหนึ่งว่าเท่ากับ อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส หรือไม่และผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 – 15 นาที วัดค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.9 – 7.1

(4) ใช้ปิเปตอัตโนมัติ ปั๊มสารละลาย rumen liquor buffer จำนวน 30 มิลลิลิตร ลงในหลอด (syringe) ที่มีตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส อ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 4, 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแก๊สไว้ ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้น

มากที่ระยะ 6, 8 หรือ 24 ชั่วโมง ให้ทำการไล่ออก โดยดันแกนหลอดกลับมาที่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำเครื่องหมาย ↓ ไว้ในตารางข้อมูล เพื่อให้ทราบว่าได้ทำการปรับปริมาตรแล้ว อ่านค่าแก๊สเป็นระยะ ๆ (เสาวลักษณ์, 2542)

(5) การทดสอบ Standardization

(5.1) Blank โดยการ incubate rumen liquor กับ medium mixture โดยไม่มีตัวอย่างอาหารในไซริงก์ (บันทึกค่าแก๊สที่เกิดขึ้น = GP_0)

(5.2) หาค่า Standard โดยทำการ incubate ตัวอย่างอาหารมาตรฐานที่ทราบค่าการเกิดแก๊สแล้วที่ 24 ชั่วโมง ทำอย่างละ 3 ไซริงก์ ค่าแก๊สมาตรฐานที่ได้เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำอย่างละ 3 syringe ค่าแก๊สมาตรฐานที่ได้เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างอาหารมาตรฐานเป็นดังนี้

	น้ำหนัก	GP มาตรฐานที่ 24 ชั่วโมง
Standard Hay	200 mg DM	44.43 ml (GPh)
Standard Concentrates	200 mg DM	65.18 ml (GPc)

คำนวณปรับปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นให้ได้เป็น มิลลิลิตรต่อ 200 mgDM พอดี

(5.3) ตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์และ/หรือความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการทำการทดลองโดยคำนวณ Factor ซึ่งจะได้ไม่เกินช่วง 0.9 - 1.1 ดังนี้

$$FH \text{ (Hay Factor)} = 44.43/(GPH - GP_0)$$

$$FC \text{ (Concentrate Factor)} = 65.18/(GPC - GP_0)$$

เมื่อ GP คือ ค่าของแก๊สที่เกิดขึ้นจากการวัดตัวอย่างมาตรฐาน และ Blank จริง ๆ ถ้า Factor ที่ได้อยู่นอกเหนือจากค่า 0.9 - 1.1 ต้องทำซ้ำใหม่ การมี Standard จะช่วยทำให้ทราบสาเหตุของ ความแปรปรวน เช่น ถ้าค่า FH สูงเกิน 1.0 หรือ FC อยู่ต่ำกว่า 0.9 แสดงว่ามี cellulolytic activity น้อย จะต้องปรับปรุง โดยเพิ่มสัดส่วนของหญ้าแห้ง ในอาหารสัตว์ทดลองเจาะกระเพาะ โดยที่

Standard Hay = ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียพวก Cellulolytic

Standard Concentrate = ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของแบคทีเรียพวก Amylolytic

4) การคำนวณผล

นำค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในไซริงก์ ที่เป็น blank (GP_0) ซึ่งปกติจะได้ประมาณ 6-12 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง ไปหักออกจากค่าแก๊สที่เกิดจากตัวอย่างมาตรฐาน และตัวอย่างที่ต้องการ

ศึกษาที่ได้มีการปรับให้มีปริมาณวัตถุแห้งเป็น 200 มิลลิกรัม พอดี จะได้ค่าแก๊สสุทธิ (GP) ดังในสูตรคำนวณที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้

$$GP\ (ml/200\ mgDM,24\ h) = \left[(V_{24} - v_0 - GP_0) \times 200 \times (FH + FC)/2\right]/W$$

เมื่อ V_0 = ปริมาตรของส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านได้ข้าง syringe ก่อน incubate

V_{24} = ค่าที่อ่านได้เมื่อ incubate ได้ 24 ชั่วโมง

GP_0 = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดใน syringe ที่เป็น blank อ่านที่ 24 ชั่วโมง

FH = $44.43/(GPh - GP_0)$ = roughage correction factor

FC = $65.18/(GPc - GP_0)$ = Concentrate correction factor

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นมิลลิกรัม วัตถุแห้ง (mgDM)

สำหรับค่าแก๊สที่อ่านเป็นระยะ ๆ ที่ชั่วโมงต่าง ๆ นำไปเขียนกราฟและเข้าสมการ เพื่อคำนวณอัตราการเกิดแก๊ส โดยใช้สมการในทำนองเดียวกับ *in sacco* คือ

$$P = A + B\,(1 - e^{-ct})$$

เมื่อ P = ปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นที่เวลา t (gas production at time t)

A = ปริมาตรเริ่มต้น (initial gas volume)

B = ปริมาตรแก๊สสูงสุด (potential gas production)

c = อัตราการเกิดแก๊ส (degradation rate)

ค่าการย่อยสลายจากปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น นำมาทำนายปริมาตรวัตถุแห้งที่กินได้ (DMI) และปริมาณวัตถุแห้งย่อยได้ที่สัตว์ได้รับ (DDMI) โดยใช้สมการ BlÜmmel and Ørskov (1993) ดังนี้

DMI (kg/day) = 1.529 + 0.455a + 0.0324b

DDMI (kg/day) = -0.933 + 0.301a + 0.0496b

นำค่าตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ Ash และ CP ตามข้อ 2) ในข้อ 3.2.2 ไปแทนค่าในสมการ เพื่อหาค่าการย่อยได้ขององอินทรีย์วัตถุและค่าพลังงานใช้ประโยชน์และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม

สมการที่ใช้ในการคำนวณหาค่าการย่อยได้ ของอินทรีย์วัตถุ(Organic matter digestibility, OMD, %), ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (Metabolizable energy, ME MJ/kg DM) และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (Net energy for lactation, NEL MJ/kg DM) จากสมการของ Menke and Steingass (1988) ดังนี้

$$\text{OMD (\%)} = 15.38 + 0.8453\ GP + 0.0595XP + 0.0675XA \quad (R^2=0.91)$$

$$\text{ME (MJ/kg)} = 2.20 + 0.1357GP + 0.0057\ XP + 0.0002859\ (XP)^2 \quad (R^2=0.94)$$

$$\text{NEL (MJ/kg)} = 0.54 + 0.0959\ GP + 0.0038\ XP + 0.0001733\ (XP)^2 \quad (R^2=0.93)$$

เมื่อ OMD = การย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ

ME = พลังงานเมแทบอไลซ์

NEL = พลังงานสุทธิเพื่อการให้นม

GP = ปริมาณ gas (ml.) ที่เกิดขึ้นเมื่อ incubated 24 ชั่วโมง

XP = ปริมาณโปรตีน (g/kg DM)

XA = ปริมาณเถ้า (g/kg DM)

1Mcal = 4.184 MJ

สมการเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการทำนายตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้ศึกษา การย่อยได้หรือวัดพลังงาน โดยตรงต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance ตามแผนการทดลองแบบ Split – Plots in Randomized Complete Block Design (Steel and Torrie,1960) และทดสอบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test.(Little and Hills, 1972) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT 1991.

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

3.4.1 ทำการปลูกหญ้าในการวิจัย 3 แห่ง คือ

1) แปลงทดลองที่ 1) แปลงทดลองในสวนลำไยแม่เหียะ ของสถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2) แปลงทดลองที่ 2) แปลงทดลองแม่เหียะ ของสถานีวิจัยและฝึกอบรมเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

3) แปลงทดลองที่ 3) แปลงทดลองในสวนลำไยสันทราย เลขที่ 302 หมู่ที่ 4 ตำบลหนองจ๊อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1) ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2) กลุ่มงานวิเคราะห์อาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ราชเทวี กรุงเทพฯ

3.4.3 ทำการศึกษาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนลอน (*in sacco*)

1) คอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

3.4.4 ทำการศึกษาการย่อยได้แบบ *in vitro* โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (gas production technique)

1) คอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

3.5. ระยะเวลาทำการวิจัย

3.5.1 ทำการปลูกหญ้าในการวิจัย ระหว่างเดือน เมษายน 2541 - มีนาคม 2542

3.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ระหว่างเดือน เมษายน - พฤษภาคม 2542

3.5.3 ทำการศึกษาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนลอน (*in sacco*) ระหว่างเดือน เมษายน - พฤษภาคม 2542

3.5.4 ทำการศึกษาการย่อยได้แบบ *in vitro* โดยวิธีวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น (gas production technique) ระหว่างเดือน เมษายน - พฤษภาคม 2542