บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การประเมินคุณภาพของหญ้าเนเปียร์ที่หมักร่วมกับสารช่วยหมักชนิดต่างๆ

1.1 พืชที่ใช้ในการหมัก

ใช้หญ้าเนเปียร์ที่เจริญเติบโตขึ้นมาใหม่จากเหง้าเดิมในแปลงของฟาร์มทดลองหมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัดที่อายุระหว่าง 60 – 90 วัน ด้วยเครื่องตัดแบบสะพาย และหั่นให้มีขนาด 2 – 3 เซนติเมตรด้วยเครื่องหั่น ก่อนที่จะนำมาผสมกับสารช่วยหมักชนิดต่างๆ ได้แก่ กากน้ำตาล ใบมันสำปะหลัง เปลือกเมล็ดถั่วเหลือง และใบกระถิน

1.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) โดยแบ่งพืชหมักออกเป็น 4 treatments และ 4 replication ดังนี้

Treatment 1 หมักร่วมกับกากน้ำตาล 5 %

Treatment 2 หมักร่วมกับใบมันสำปะหลัง 15 %

Treatment 3 หมักร่วมกับเปลือกเมล็ดถั่วเหลือง 20 %

Treatment 4 หมักร่วมกับใบกระถิน 20%

1.3 วิธีการหมัก

นำหญ้าเนเปียร์ที่หั่นให้มีขนาด 2 – 3 เซนติเมตรมาผสมกับสารช่วยหมักชนิดต่างๆ ตามแผนการทดลองแล้วอัดลงในถังพลาสติกขนาดความจุ 120 ลิตรที่มีฝาปิดและเข็มขัดล็อคด้วยแรงงานคน ปิดทับด้านบนด้วยพลาสติกหนาสีดำก่อนทำการปิดฝาและล็อคเข็มขัดที่ฝาถังให้แน่น หมักไว้เป็นเวลา 1 เดือน

1.4 การสุ่มและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างหญ้าเนเปียร์จากถังหมัก ถังละ 4 จุด คือ ส่วนบน กลาง ข้าง และส่วนล่าง นำตัวอย่างจากถังเดียวกันผสมรวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.1 การประเมินคุณภาพพืชหมักในสภาพสด

1. ทำการประเมินคุณภาพพืชหมักโดยใช้ประสาทสัมผัส (Gross,1982 อ้างโดยบุญล้อมและคณะ, 2543) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 1
2. วัดความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของพืชหมัก โดยใช้พืชหมัก 50 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นในโถปั่น (blender jar) นาน 30 วินาทีแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter (Bal *et al.*,1997)
3. วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์โดยการกลั่น (Zimmer, 1966 อ้างโดยบุญล้อมและบุญเสริม, 2525) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 2
4. วิเคราะห์หาแอมโมเนียในพืชหมัก (Chen *et al.*, 1994) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 3

1.4.2 การประเมินคุณภาพพืชหมักในสภาพไร้ความชื้น

1. วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งของหญ้าหมัก โดยนำหญ้าเนเปียร์หมักมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียวัตถุแห้งตามสมการ (1) เสนอโดย Nagel and Broderick (1992)

$$\text{DM loss (\%)} = \frac{\left\{(\text{DM} \times \text{weight} / 100)_{\text{before ensilage}} - (\text{DM} \times \text{weight} / 100)_{\text{after ensilage}}\right\} \times 1}{(\text{DM} \times \text{weight} / 100)_{\text{before ensilage}}} \quad (1)$$

2. นำหญ้าหมักที่อบแล้วมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 2000) และหาเยื่อใยโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970)

1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) โดยใช้โปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ศึกษาการย่อยได้ของโภชนะและค่าพลังงานของหญ้าเนเปียร์หมักทั้ง 4 Treatments โดย เทคนิคการวัดปริมาณแก๊ส (gas production technique)

ค่าการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์มีความสัมพันธ์กับปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นจึงได้นำหลักการนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ตามวิธีของ Menke and Steingass (1988)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์

1. อ่างน้ำร้อน (water bath) ที่สามารถปรับอุณหภูมิให้คงที่ 39 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียสที่มีเครื่องหมุน (rotator) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตรที่ได้เจาะรูไว้สำหรับใส่หลอดตัวอย่างได้
2. จานหมุนหรือล้อหมุน (rotator) ประกอบด้วยจานกลมที่ทำด้วยแผ่นพลาสติกแข็ง 2 จาน เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตรซึ่งจานนี้เจาะรูไว้ 60 รูแต่ละรูมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 36 มิลลิเมตร เพื่อเป็นช่องสำหรับเสียบหลอดตัวอย่างอาหาร (piston - pipettes) ที่ฐานหรือแกนจานมีสายพานติดมอเตอร์ไฟฟ้าให้จานหมุนได้ด้วยความเร็ว 1 – 2 รอบต่อนาที
3. หลอดตัวอย่างอาหาร (piston – pipettes หรือ glass syringes) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 36 มิลลิเมตร ภายใน 32 มิลลิเมตร ยาว 200 มิลลิเมตรความจุ 150 มิลลิเมตร มีขีดบอกปริมาตรถึง 100 มิลลิเมตร อ่านค่าได้ละเอียด 1 มิลลิเมตร(ลักษณะคล้ายหลอดฉีดยาขนาดใหญ่) ปลายหลอดติดกับสายยาง (silicone tube) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 มิลลิเมตร ยาว 40 มิลลิเมตร และมีคลิปหนีบพลาสติกเพื่อปิดเปิดให้แก๊สออกได้
4. อุปกรณ์สำหรับเก็บน้ำจากกระเพาะหมัก (rumen fluid)ของสัตว์ที่ได้เจาะกระเพาะไว้แล้ว และภาชนะสำหรับใส่น้ำจากกระเพาะหมักที่มีความจุประมาณ 1 ลิตร
5. อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น
   - ปิเปตอัตโนมัติขนาด 50 มิลลิลิตร
   - เครื่องกวนสารละลายระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
   - ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

2.1.2 สารเคมี

1. micro mineral solution ประกอบไปด้วย

   13.2 g $CaCl_2 . 2H_2O$ + 10.0 g $MnCl_2 . 4H_2O$ + 1.0 g $CoCl_2 . 6H_2O$ +8.0 g $FeCl_3 . 6H_2O$ ละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. buffer solution ประกอบไปด้วย

   4 g NH_4HCO_3 + 35 g $NaHCO_3$ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. macro mineral solution ประกอบไปด้วย

   5.7 g Na_2HPO_4 (anhydrous) + 6.2 g KH_2PO_4 (anhydrous) + 0.6 g $MgSO_4$ .7H2O ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. resazurin solution 0.1% (W/V)

   ชั่ง 100 mg resazurin ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

5. reduction solution (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง และเตรียมก่อนเวลาเก็บ rumen fluid เพียงเล็กน้อยประกอบด้วย 2ml 1N NaOH + 312 mg Na_2 S_9H_2O ใส่ลงในน้ำ 47.5 มิลลิลิตร)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 นำหญ้าเนเปียร์หมักที่ได้จากการทดลองที่ 1 ทั้ง 4 Treatments มาทำให้แห้งโดยวิธี Freeze dry เพื่อลดการสูญเสียโภชนะจากความร้อนจากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่ผ่านการอบแห้งบดผ่านตะแกรง 1 mm แล้วชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 200 mg ใส่ลงในหลอดแก้วที่คล้ายกระบอกฉีดยาที่มีขีดอ่านปริมาตรข้างหลอด โดยที่ปลายหลอดมีสายยางสั้นๆและที่หนีบสำหรับปิดเปิดที่ปลายหลอด ทำตัวอย่างละ 4 ซ้ำและต้องมีหลอด blank คือไม่ใส่ตัวอย่างอาหารจำนวน 6 หลอดและหลอดสำหรับตัวอย่างอาหารหยาบและอาหารข้นมาตรฐานชนิดละ 3 หลอด เพื่อใช้ในการปรับค่าแก๊ส ก่อนใส่อาหารลงในหลอดแก้วควรทดสอบหลอดแก้ว (glass syringe) และแกนดัน (piston) โดยทาวาสลินบางๆรอบแกนดัน แล้วลองใส่แต่ละคู่ให้พอดีกัน ไม่หลวมและฝืดจนเกินไป อุ่นหลอดที่ใส่ตัวอย่างอาหารไว้แล้วในตู้อบ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.2.2 การเตรียม medium ให้เติมสารละลายดังต่อไปนี้ (ตาราง 12)

ตาราง 12 ส่วนประกอบของ rumen buffer medium ที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีวัดปริมาณแก๊ส

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ต่อ 1 หลอด
1. น้ำกลั่น	10.0
2. Buffer solution	5.0
3. Macro mineral solution	5.0
4. Resazurin solution	0.025
5. Micro mineral solution	0.0025
6. Reduction solution	1.0
7. Rumen fluid	10.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อความสะดวกในการปิเปตควรเตรียมสารละลายเผื่อปริมาณที่ต้องการไว้อีก 10 หลอด ผสมสารละลายหมายเลข 1 – 5 ก่อนที่จะเก็บน้ำจากกระเพาะหมัก แช่สารละลายในอ่างน้ำอุ่น 39 องศาเซลเซียส ทำให้มีสภาพไร้ออกซิเจนโดยการผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปตลอดเวลา คนด้วย magnetic stirrer จากนั้นเติม reduction solution (สารละลายหมายเลข 6) สีของสารละลายจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู และไม่มีสีตามลำดับ แสดงว่าเกิด reduction อย่างสมบูรณ์แล้วจึงค่อยๆ เติม rumen liquor มิฉะนั้นค่าที่ได้จะไม่ถูกต้อง เพราะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดจะถูกนำไปใช้ในการ reduction

2.2.3 การเก็บน้ำจากกระเพาะหมัก และการ incubate กับตัวอย่าง ควรเก็บน้ำจากกระเพาะหมักก่อนให้อาหารสัตว์มื้อเช้า ขวดที่เก็บควรมีขนาด 1 ลิตร และทำขวดให้มีสภาพไร้ออกซิเจนโดยการผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป และลวกขวดด้วยน้ำอุ่น การเก็บน้ำจากกระเพาะหมักต้องเก็บให้เต็มขวดเพื่อเป็นการไล่อากาศออกอีกทางหนึ่งโดยใช้สายยางสอดลงไปที่ส่วนล่างของกระเพาะหมัก (ventral sac) เพื่อเก็บน้ำจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) และควรใช้กระติกที่ช่วยรักษาอุณหภูมิของน้ำจากกระเพาะหมักให้คงที่

ตวงน้ำจากกระเพาะหมักตามต้องการแล้วผสมกับสารละลายหมายเลข 1 – 6 ในขวดที่วางในอ่างอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสคนให้เข้ากันตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ขณะเดียวกันก็ผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงในสารละลายโดยจุ่มสายยางลงในขวด ใช้ปิเปตอัตโนมัติปั๊มสารละลาย rumen liquor buffer mixture ผ่านท่อยางเข้าในหลอดตัวอย่าง ไล่ฟองแก๊สในหลอดออกให้หมด ปิดคลิปที่ปลายหลอดท่อยาง อ่านปริมาตรของหลอดตัวอย่างและบันทึกไว้ (V_0)

2.2.4 บันทึก ค่าแก๊สที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 2 4 6 8 12 24 36 48 และ 72 ชั่วโมงและคำนวณค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมง สมการ (2) เสนอโดย Menke and Steingass (1988) ดังนี้

$$GP\ (ml/200\ mg\ DM, 24\ hr) = \frac{(V_t - V_0 - GP_t) \times 200 \times (FH + FC)/2]}{W} \quad (2)$$

เมื่อ GP = ปริมาณแก๊ส (มิลลิลิตร) ที่เกิดขึ้นเมื่อ incubate ตัวอย่างอาหาร 200 มิลลิกรัม (วัตถุแห้ง) ที่เวลา t ชั่วโมง

GP_t = ค่าเฉลี่ยของแก๊สที่เกิดในหลอด blank ที่ t ชั่วโมง

V_0 = ปริมาณส่วนผสมทั้งหมดที่อ่านก่อน incubate

V_t = ปริมาณแก๊สเมื่อ incubate ได้ t ชั่วโมง

W = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัมวัตถุแห้ง)

FH = $44.43 / (GP_h - GP_0)$ ค่าปรับอาหารหยาบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

FC = 65.18 / $(GP_c - GP_0)$ ค่าปรับอาหารข้น

Gph = ปริมาณแก๊สที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหารหยาบมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

Gpc = ปริมาณแก๊สที่เกิดจากการ incubate ตัวอย่างอาหารข้นมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

ทำนายค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ (organic matter digestibility, OMD) และหาค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy of lactation, NE_L) สำหรับอาหารหยาบ (roughages) ตามสมการ (3, 4, 5) ที่เสนอโดย Menke and Steingass (1988)

$$OMD\ (\%) = 15.38 + 0.8453GP + 0.0595XP + 0.0675XA \quad (3)$$

$$ME\ (MJ/kg) = 2.20 + 0.1357GP + 0.0057XP + 0.0002859XL^2 \quad (4)$$

$$NE_L\ (MJ/kg) = 0.54 + 0.0959GP + 0.0038XP + 0.0001733\ XL^2 \quad (5)$$

เมื่อ XP = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XA = ปริมาณเถ้า (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

XL = ปริมาณไขมันในตัวอย่าง (กรัมต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง)

2.3 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคลูกผสมพื้นเมือง x โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 2 ตัว อายุ 4 – 7 ปีน้ำหนักเฉลี่ย 321 กิโลกรัมที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง rumen fistula และ สอดฝังท่อที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และส่วนปลาย (T-shape cannula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย,2530) โดยโคทุกตัวอยู่ในคอกผูกยืนโรง มีที่ให้น้ำอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 8.30 น. และ 16.30 น. มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา ควรเก็บน้ำจากกระเพาะหมักสัตว์อย่างน้อย 2 ตัวผสมกันเพื่อลดความ แปรปรวนจากตัวสัตว์

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range (Steel and Torrie, 1980) โดยใช้โปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ของหญ้าเนเปียร์หมักทั้ง 4 Treatments ในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารในตัวสัตว์

การหาค่าการย่อยได้ของโภชนะในโคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ วิธีการหาค่าการย่อยได้แบบดั้งเดิม (conventional method) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) และการหาค่าการย่อยได้โดยตัวสัตว์ภายในลำไส้เล็กด้วยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator method) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.1 การหาค่าการย่อยได้โดยวิธีดั้งเดิม (conventional method)

ให้โคทดลองได้รับหญ้าเนเปียร์หมักทั้ง 4 treatments ร่วมกับอาหารข้น 16 % CP สูตรที่มีเปลือกเมล็ดถั่วเหลือง (Soybean hulls, 60%) เป็นหลัก (สุกัญญา,2546) อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ (concentrate : roughage ratio) เท่ากับ 25 :75 เมื่อคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้ง

ระยะเวลาในการทดลอง มี 4 ช่วงการทดลอง แต่ละช่วงใช้เวลา 22 วันโดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

1 ระยะการปรับตัว (preliminary period) คือเป็นช่วงที่ปล่อยให้โคและจุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับอาหารและขับถ่ายอาหารเดิมในทางเดินอาหารออกให้หมด โดยในระยะนี้ใช้เวลา 14 วัน

2. ระยะการเก็บข้อมูล (collection period) ใช้เวลา 8 วัน แบ่งออกเป็น 2 ช่วง

- ช่วงแรกเป็นการเก็บมูล (faces) เพื่อหาค่าการย่อยได้ปรากฏ (apparent digestibility) ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่กินและมูลทั้งหมดในแต่ละวัน สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและมูล 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ขับออกมาทั้งหมดในแต่ละวัน นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี แล้วนำค่าต่างๆ มาคำนวณหาการย่อยได้ปรากฏโดยใช้สมการ (6) ที่เสนอโดย บุญล้อม (2540)

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้} = \frac{\text{โภชนะที่กิน - โภชนะที่ขับออก}}{\text{โภชนะที่กิน}} \times 100 \qquad (6)$$

ประเมินค่าโภชนะย่อยได้รวม (total digestible nutrient, TDN) จากสมการ (7)

$$TDN = DCP + DNDF + DNFC + 2.25 \times DEE \qquad (7)$$

เมื่อ DCP = โปรตีนที่ย่อยได้

DNDF = เยื่อใยที่ละลายในด่างที่ย่อยได้

DNFC = คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใยที่ย่อยได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DEE = ไขมันที่ย่อยได้

คำนวณค่าพลังงานรวม (gross energy, GE) พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy, ME) และพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (net energy for lactation, NE_L) จากสมการที่ (8, 9, 10) เสนอโดย Kellner *et al.* (1984)

$$GE\ (MJ/kg) = 0.242CP + 0.0366EE + 0.0209CF + 0.0170NFE \quad (8)$$

$$ME\ (MJ/kg) = 0.0152DCP + 0.0342DEE + 0.0128DCF + 0.0159DNDF \quad (9)$$

$$NE_L(MJ/kg) = 0.4632 + 0.0024q \times ME \quad (10)$$

เมื่อ DNFE = ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกที่ย่อยได้

q = (ME/GE) × 100

3.2 การหาค่าการย่อยได้โดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (indicator method)

ในการศึกษาการย่อยได้จริงภายในลำไส้เล็กของโค ไม่สามารถวัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านทางเดินอาหารบริเวณลำไส้เล็กได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการใช้สารบ่งชี้ (marker) เพื่อเป็นค่าชี้วัดปริมาณอาหารที่เดินทางผ่านลำไส้เล็กจึงน่าจะเป็นวิธีการที่มีเหมาะสมมากที่สุดซึ่งในการทดลอง นี้ใช้ไททาเนียมไดออกไซด์เป็นสารบ่งชี้โดยทำการผสมสารบ่งชี้ลงในอาหารข้นร้อยละ 0.2

3.2.1 วิธีการทดลอง

การวัดค่าการย่อยได้โดยอาศัยสารบ่งชี้จะดำเนินการต่อเนื่องภายหลังจากเสร็จสิ้นขบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อการหาค่าการย่อยได้ปรากฏ โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายที่ได้สอดฝังท่อ (T – shape canula)ไว้แล้วเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 4 วันเพื่อให้ได้ตัวแทนของตัวอย่างทั้ง 24 ชั่วโมงโดยมีตารางเวลาเก็บตัวอย่างดังตาราง 13

ตาราง 13 ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างจากลำไส้เล็กของการทดลองหาค่าการย่อยได้โดยอาศัยสารบ่งชี้

วัน	ช่วงเวลา (นาฬิกา)					
1	08.00	12.00	16.00	20.00	24.00	04.00
2	09.00	13.00	17.00	21.00	01.00	05.00
3	10.00	14.00	18.00	22.00	02.00	06.00
4	11.00	15.00	19.00	23.00	03.00	07.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละครั้งให้ได้ประมาณ 200 – 250 มิลลิลิตร หรือใช้เวลาในการเก็บประมาณ 45 นาทีต่อครั้ง และนำตัวอย่างมารวมกันเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง – 20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์ห้องประกอบทางเคมี และหาค่าความเข้มข้นของสารบ่งชี้ และนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้จากสมการที่ (11) ที่เสนอโดยเทอดชัย (2540)

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (\%)} = 100 - 100 \times \left\{ \frac{\text{\% สารบ่งชี้ใน duodenum}}{\text{\% สารบ่งชี้ใน ileum}} \times \frac{\text{\% โภชนะใน ileum}}{\text{\% โภชนะใน duodenum}} \right\} \quad (11)$$

3.2.2 การศึกษาสภาพภายในกระเพาะหมัก

3.2.2.1 วิเคราะห์หากรดไขมันระเหยได้ โดยการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ประมาณ 250 มิลลิลิตรลงในขวดที่ปิดสนิท เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4)1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวจากกระเพาะหมัก เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส (freezer) เพื่อรอการวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยเครื่อง Shimushu Gas chromatography (Ishler,1996) รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 4

3.2.2.2 วิเคราะห์หาแอมโมเนียไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในกระเพาะหมักด้วยวิธี Conway method (Voigt and Steger,1967) โดยเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) เพื่อทำการวัด ซึ่งจะทำการวัดก่อนที่โคจะการกินอาหาร 1 ชั่วโมงและหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง รายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก 5

3.2.2.3 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ซึ่งทำการวัดก่อนที่โคจะกินอาหาร 1 ชั่วโมง และวัดหลังจากโคกินอาหารแล้ว 1, 2, 3, 4 และ 5ชั่วโมง โดยสอดท่อลงไปเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen fluid) ในส่วนล่างของกระเพาะหมัก (ventral sac) ประมาณ 250 มิลลิลิตรใส่ลงในภาชนะเพื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักของโค (ruminal pH) ด้วยเครื่องวัด pH แบบพกพายี่ห้อ pH scan BNC™ ซึ่งมีค่าความถูกต้อง ±0.1 ปรับความเที่ยงตรงด้วย บัฟเฟอร์ 4 และ 7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคลูกผสมพื้นเมือง x โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 2 ตัว อายุ 4 – 7 ปีน้ำหนักเฉลี่ย 305 กิโลกรัมที่ได้รับการเปิดท่อทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะหมักโดยการเจาะกระเพาะฝัง rumen fistula และ สอดฝังท่อที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และส่วนปลาย (T-shape cannula) (ทัศนีย์ และเทอดชัย,2530) โดยโคทุกตัวอยู่ในคอกผูกยืนโรงมีที่ให้น้ำอัตโนมัติ และรางอาหารแยกเฉพาะตัว โคได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 8.30 น. และ 16.30 น. มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ 4 x 4 Latin Square Design และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) โดยใช้โปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2537)

3.4 สถานที่ดำเนินการศึกษาวิจัย

- ฟาร์มทดลองหมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.5 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ใช้ระยะเวลาในการทดลองประมาณ 12 เดือน ระหว่างเดือน มิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved