วิทยานิพนธ์ งานวิจัย สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการทดลองการทดลองจะดำเนินการเป็นไปตามที่วางแผนเอาไว้ดังนี้

3.1 สัตว์ทดลอง

1. โคนมเพศเมีย อายุ 1 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 150±10 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว
2. สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอกก่อนเข้าการทดลอง
3. สัตว์ทุกตัวได้รับการฉีดวิตามินเอ, ดี และอี ก่อนเข้าการทดลอง

3.2 แผนการทดลอง

การเตรียมยีสต์หมักมาเลท

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ถังหมัก

1.2 air pump

1.3 pH – meter

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อยีสต์ baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก

3.4 การเตรียมยีสต์และกระบวนการหมักในถังหมัก

1. ทำการ warm เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจำนวน 20 กรัม ร่วมกับผสม น้ำตาล 20 กรัม ในขั้นตอนสุดท้ายผสมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตรหลังจากนั้นทำการกวนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ทำการเตรียมอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ โดยใช้กากน้ำตาล 24 กรัม ร่วมกับยูเรีย 4 กรัม และมาเลท 3 กรัมหลังจากนั้นเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร และทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียว
3. ทำการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 3.5 – 4.5 โดยใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้น หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ทำการผสมเชื้อยีสต์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ทำการให้ออกซิเจนตลอดระยะเวลาในการทำการศึกษาในวันที่ 1 – 2

193704

5. นำน้ำหมักยีสต์ที่หมักครบระยะเวลาในปริมาณ 200 มิลลิลิตร มาผสมกับกากน้ำตาล 12 กรัมร่วมกับยูเรีย 2 กรัมหลังจากนั้นเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร ร่วมกับปรับ pH อยู่ในช่วง 4.5 ด้วย กรด H_2SO_4 เข้มข้น และทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียว
6. หลังจากนั้นนำน้ำหมักยีสต์ที่ถูกผสมด้วยยูเรียและกากน้ำตาลและมาเลทให้เป็นเนื้อเดียวกันต่อมันเส้นในสัดส่วน 125 มิลลิลิตร : 500 กรัม มาคลุกเคล้าให้เข้ากัน

3.5 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบประชากรสองกลุ่มที่อิสระต่อกัน โดยสุ่มสัตว์ทดลองแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม และมีจำนวน 2 ตัวต่อกลุ่ม ซึ่งมีทรีทเมนต์ (Treatment) ที่ทดสอบดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1: เสริมอาหารข้นโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์

ทรีทเมนต์ที่ 2: เสริมมันเส้นหมักยีสต์-มาเลท

หมายเหตุ : สัตว์ทุกตัวทั้งสองกลุ่มจะได้รับการเสริมทรีทเมนต์ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวร่วมกับอาหารหยาบฟางข้าว อย่างกินเต็มที่ (*ad libitum*)

3.6 แผนผังการทดลอง

กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง
C1	A1
C2	A2

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

C1 หมายถึง สัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมจะไดรับอาหารข้นโปรตีน16% ปริมาณ 2 กก/ตัว/วัน

A1 หมายถึงสัตว์ทดลองกลุ่มได้รับทรีทเมนต์คือมันเส้นหมักยีสต์และสารมาเลท 2 กก /ตัว/วัน

3.7 วิธีการดำเนินการทดลอง

1. ก่อนเข้าการทดลอง ทำการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอก และทำการฉีดวิตามิน เอ ดี และอี พร้อมทั้งฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยและโรคคอบวมให้สัตว์ทุกตัว

2. ระยะปรับสัตว์ก่อนเข้าทดลอง ให้สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางเป็นอาหารหยาบแบบเต็มที่ และให้อาหารข้นตาม ทรีทเมนต์ที่สัตว์ได้นับในคอกทดลอง เป็นเวลา 14 วัน เพื่อเป็นการปรับสัตว์ให้คุ้นเคยกับอาหารและคอกทดลอง

3. สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบ T-Test โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับทรีทเมนต์ตามที่กำหนด โดยแต่ละช่วงการทดลองมีระยะเวลา 30 วัน

3.8 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์โดยทำการชั่งน้ำหนักก่อนเข้าช่วงการทดลอง (period) และในวันที่ 14 ก่อนสัตว์ทดลองอยู่บนกรงเมทธาโบลิซึม และในวันที่ 21 หลังจากอยู่บนกรงเมทธาโบลิซึมของทุกระยะการทดลองเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณการกินได้อิสระ, ความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะและการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก (weight change) ของสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงการทดลอง

2. บันทึกปริมาณการให้อาหารการหาปริมาณการกินได้ในแต่ละวันโดยทำการจดบันทึกปริมาณอาหารที่กินให้และอาหารที่เหลือทั้งเช้าและเย็นทุกวัน

การกินได้ต่อวัน(วัตถุแห้ง) = [อาหารให้ตอนเช้า (วัตถุแห้ง)-อาหารเหลือตอนเช้า (วัตถุแห้ง)]
+ [อาหารให้ตอนเย็น(วัตถุแห้ง)-อาหารเหลือตอนเย็น (วัตถุแห้ง)]

3.9 การสุ่มเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะ

เริ่มทำการเก็บพร้อมกับการเก็บปัสสาวะ ในช่วงท้ายของการทดลองโดยทำการเก็บในช่วงเช้า เวลา 06.30 น. โดยทำการชั่งน้ำหนักมูลทั้งหมด การเก็บมีถาดรองมูลซึ่งอยู่ด้านหลังของถาดรองปัสสาวะ ก่อนเก็บทำการคลุกทุกส่วนให้เข้ากัน และแบ่งเก็บออกเป็น 2 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 เก็บประมาณ 1 กิโลกรัม นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์หาวัตถุแห้งของมูลที่ขับถ่ายออกมาในแต่ละวัน

ส่วนที่ 2 เก็บไว้ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมูลทั้งหมดในแต่ละวัน นำไปเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเช่นนี้จนครบ 5 วัน แล้วนำมูลทั้งหมดในปริมาณที่เท่ากันของแต่ละกลุ่มทดลองที่เก็บไว้มา คลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการสุ่มเก็บอีกครั้งและนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้งสนิท แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 0.1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

5. เก็บตัวอย่างของปัสสาวะ และเติม 1M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1 M H_2SO_4ต่อปัสสาวะในสัดส่วน 1:10 เพื่อเป็นการตรึงไนโตรเจนในปัสสาวะก่อนที่จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิประมาณ –5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของพิวรีน (Purine derrivertive)เพื่อใช้ใน

การประเมินการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีน โดยการใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp.) ดัดแปลงตามวิธีของ Resines et al., (1992)

6. เก็บตัวอย่างเลือด ที่เวลา 0, 1, 2, 4 , 6 และ 8 ชั่วโมงหลังการให้อาหาร ในวันที่ 21 ของแต่ละช่วงการทดลอง โดยเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge)และเก็บส่วน plasma เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียในเลือด (blood urea nitrogen, BUN)

7. สุ่มวัดความเป็นกรด–ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักโดยใช้ pH meter (HANNA instruments HI 8424 microcomputer)

ส่วนที่ 1 ประมาณ 90 มิลลิลิตรปรับให้มีค่า pH ประมาณ < 3 ด้วยการเติม 1M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1M H_2SO_4 ต่อของเหลวจากกระเพาะหมัก ในสัดส่วน 1 : 10 เพื่อหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใส แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N)โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965)

ส่วนที่ 2 นำ rumen content ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่บรรจุ 10% formaline in normal saline with methyl green ในปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าขวดเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปนับโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3.10 การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดย analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลอง T-Test โดยใช้ Proc.TTEST (SAS, 1998) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.11 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

- โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ ปี 2551-2552 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

กิจกรรมต่างๆ ที่ปฏิบัติ	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.เตรียมวัตถุดิบอาหาร และอุปกรณ์เครื่องมือ	←	→										
2. ระยะเวลาปรับสัตว์ทดลอง			←	→								
3. ระยะเวลาทดลอง					←	→						
4. วิเคราะห์ตัวอย่าง							←	→	→	→		
5.สรุปผลและเขียนรายงานผล											←	→

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY