# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 3.1 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ (Bioactive) และการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ของกัญชา

กัญชาใช้ส่วนใบรวมก้านนำมาอบด้วยตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร (mm) และทำการสุ่มตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แช่ Ethanol 95% ปริมาณ 200 ml ระยะเวลา 1 วัน หลังจากนั้นกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง No. 1 ระเหยด้วยเครื่อง Rotary Evaporator แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วย Ethanol 95% เพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ คือ THC และ CBD โดยใช้เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-8890 ยี่ห้อ Agilent ตามวิธีการของ หนึ่ง เตียอำรุ่ง (2564)

ตัวอย่างของใบรวมก้านกัญชาที่สกัดได้ตามวิธีข้างต้น นำมาตรวจสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์สาร เบต้าแคโรทีน (β-carotene) DPPH (2,2-diphenyl-l-picrylhydrazyl) และ ABTS (3-ethybenzothialzoline-b-Sulfonic acid) ตามวิธีการของ Dawidowicz et al., (2021) โดยใช้เครื่อง Multiskan GO คำนวณผ่านโปรแกรม SkanlT 4.1

## 3.2 อาหารทดลอง

สูตรอาหารทดลองใช้อาหารผสมสำเร็จ TMR โดยมีข้าวโพดสับหมักเป็นแหล่งอาหารหยาบผสมกับใบรวมก้านกัญชาในระดับ 0% 10% 20% และ 30% จากนั้นทำการสุ่มอาหาร TMR นำมาอบด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดผ่านตะแกรงขนาด 1 mm. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีการโดยประมาณ Proximate analysis (AOAC, 2010) โดยวิเคราะห์วัตถุแห้ง Dry matter (DM) ด้วยเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 100±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วิเคราะห์เถ้า (Ash) ด้วยเครื่อง Muffle furnace โดยการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP) โดยใช้เครื่อง Kjeltec ™8100 Distillation Unit ยี่ห้อ FOSS ตามวิธีการของ macro-Kjeldahl method (AOAC, 2010) และไขมัน (Ether extract) โดยใช้เครื่อง Automatic soxhlet extraction นอกจากนี้การวิเคราะห์เยื่อใยศึกษาตามวิธีการของ Goering and VanSoest (1970) ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกลาง (Neutral detergent fiber, NDF) เยื่อใยที่

ไม่ละลายในดีเทอเจนที่เป็นกรด (Acid detergent fiber, ADF) และ Acid detergent lignin, ADL โดยใช้เครื่อง Fibertec auto analyser

## 3.3 แผนการทดลอง

แผนการทดลองแบบ 4*4 Latin square โดยสูตรอาหารเลี้ยงแพะนมใช้อาหารผสมสำเร็จ TMR กำหนดระดับโปรตีนที่สัตว์จะได้รับ คือ 16% CP และ NDF ให้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยให้แพะนมแต่ละกลุ่มได้รับอาหารผสมสำเร็จ TMR แบบเต็มที่ (*Ad libitum*) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 = TMR1 อาหารผสมสำเร็จ TMR Control (DM basis)

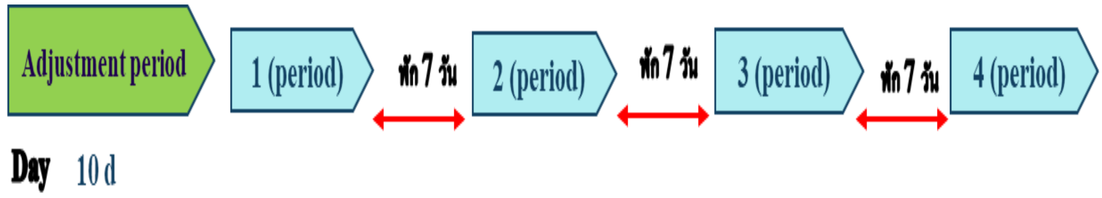
กลุ่มที่ 2 = TMR2 อาหารผสมสำเร็จ TMR ร่วมกับใบรวมก้านกัญชา 10% (DM basis)

กลุ่มที่ 3 = TMR3 อาหารผสมสำเร็จ TMR ร่วมกับใบรวมก้านกัญชา 20% (DM basis)

กลุ่มที่ 4 = TMR4 อาหารผสมสำเร็จ TMR ร่วมกับใบรวมก้านกัญชา 30% (DM basis)

## 3.4 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองได้รับการอนุญาตจากสถาบันวิจัยและพัฒนา รหัสโครงการ IACUC-66-07 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา สัตว์ทดลองใช้แพะนมสายพันธุ์ลูกผสมซาเนน (Saanen) 75% เพศเมีย จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 53.0 ± 0.56 กิโลกรัม อายุ 1-2 ปี และให้น้ำนมมาแล้ว (Day in milk, DIM) เฉลี่ย 105 ± 10 วัน ปรับสัตว์เป็นระยะเวลา 10 วัน ระหว่างปรับสัตว์ทดลอง แพะทุกตัวจะได้รับยาถ่ายพยาธิชนิด Ivermectin และวิตามิน A, $D_3$ และ E ก่อนเข้าการทดลอง และแพะทุกตัวจะถูกสุ่มอาหารทดลองแต่ละสูตร ครบทั้ง 4 สูตร เลี้ยงช่วงระยะเวลา (Period) ละ 14 วัน พักสัตว์ก่อนเริ่ม Period ใหม่เป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 3.1) แพะถูกจะเลี้ยงในคอกขังเดี่ยวขนาดทั้งหมดเท่ากับ กว้าง×ยาว (2×2) เมตร แบ่งให้อาหาร2 เวลา คือ เช้า 07.30 น. และเย็น 16.30 น. มีรางอาหารและน้ำสะอาด ก้อนแร่ธาตุ แยกเป็นรายตัวให้กินตลอดการปรับสัตว์และช่วงการทดลองรวมเป็นระยะเวลา 94 วัน




**รูปที่ 3.1** แผนระยะเวลาการทดลอง

แพะทุกตัวผ่านการเช็ดทำความสะอาดบริเวณเต้านมแพะด้วยน้ำสะอาด ก่อนถูกรีดนมด้วยมือ 2 เวลา คือ เช้า 06.30 น. และ เย็น 16.00 น. บันทึกปริมาณน้ำนมแพะเริ่มต้นรายตัวตลอดปรับสัตว์เป็นระยะเวลา 10 วัน ทำการสุ่มน้ำนมดิบไปวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำนม โดยใช้เครื่อง Funke Gerber 3510 Lactostar Fat และวิเคราะห์ค่า SCC โดยใช้เครื่อง LACTOSCAN Somatic cell court using Image Cytometry ณ โรงแปรรูปมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนเข้าการทดลอง

## 3.5 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

### 3.5.1 น้ำหนักตัว (Body weight)

ชั่งน้ำหนักแพะเริ่มต้นและสุดท้ายของแต่ละ Period โดยบันทึกน้ำหนักแพะเป็นรายตัวเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (Body weight change, BWE)

### 3.5.2 ปริมาณการกินได้ (Feed intake)

แพะจะได้รับอาหารทดลอง คือ ผสมสำเร็จ TMR ผสมรวมกับใบรวมก้านกัญชาในระดับที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ระดับ อาหารทดลองจะชั่งให้แพะ 4 กลุ่ม แบบรายตัวในแต่ละวัน และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารเหลือจากการกินทุกวันติดต่อกัน 7 วัน แต่ละ Period ทำการบันทึกข้อมูลการกินได้ หลังจากนั้นนำมารวมกัน (Pool) เพื่อสุ่มเก็บอาหารหลังกินประมาณ 10% ของแต่ละกลุ่มการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยวิธีการ Proximate analysis (AOAC, 2010) วิเคราะห์ NDF และ ADF (Goering and Van Soest, 1970)

### 3.5.3 ปริมาณน้ำนม (Milk yield) องค์ประกอบน้ำนม (Milk composition) และการวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนม (Somatic cell court; SCC)

บันทึกปริมาณน้ำนมแพะแต่ละ period แบ่งเป็น 2 เวลา คือ เช้า 06.30 น. และเย็น 16.30 น. ตลอดการทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบเป็นระยะเวลา 7 วันติดต่อกันแต่ละ Period และนำมารวมกันใส่ไว้ในขวดสีชา 250 ml เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจหาส่วนประกอบน้ำนม ได้แก่ วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งที่ไม่รวมไขมัน โดยใช้เครื่อง Funke Gerber 3510 Lactostar Fat และการวิเคราะห์ค่า SCC โดยใช้เครื่อง LACTOSCAN Somatic cell court using Image Cytometry ณ โรงแปรรูปมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และวิเคราะห์ Fat corrected milk (FCM) at 3.5% กิโลกรัมต่อวัน ตามวิธีการของ Šalavardić et al., (2021) โดยใช้สูตรการคำนวณดั้งนี้

$$3.5\%\ FCM = milk\ yield \times (0.634 + 0.1946 \times fat)$$

**3.5.4 การสุ่มเก็บตัวอย่างมูล (Feces)**

สุ่มเก็บมูลแพะจากถาดรองรับมูลใต้คอกขังเดี่ยวเก็บทั้งหมดแยกรายตัว เป็นระยะเวลา 7 วันติดต่อกันแต่ละ period และนำมารวมกันเพื่อสุ่มเก็บมูล 10% ของแต่ละกลุ่มการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยการวิธีการ Proximate analysis (AOAC, 1990) วิเคราะห์ NDF และ ADF (Goering and Van Soest, 1970) และนำไปคำนวณความสามารถในการย่อยได้ ตามวิธีการของ Schnieder and Flatt (1975) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

| |
|---|
| การย่อยได้ (%) = [(ปริมาณการกินได้ – ปริมาณมูล) / ปริมาณการกินได้] × 100 |

**3.5.5 การสุ่มเก็บตัวอย่างปัสสาวะ (Urine)**

เก็บตัวอย่างปัสสาวะแพะเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (Nitrogen) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ทำความสะอาดถังรองเก็บปัสสาวะ และเตรียมกรดซัลฟูริก ($H_2SO_4$) เข้มข้น 10% ประมาณ 80 ml ลงในถังรองเก็บปัสสาวะไว้ในช่วงเย็นก่อนการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 1 วัน เพื่อปรับให้ปัสสาวะมีค่าความเป็นกรด - ด่าง ต่ำกว่า 2 เป็นการป้องกันการสูญเสียของแอมโมเนีย (ammonia) และวัดปริมาตรของปัสสาวะในถังรองรับอยู่ใต้คอกเลี้ยงเดี่ยวรายตัว เป็นระยะเวลา 7 วันติดต่อกัน แต่ละ period และนำมารวมกันเพื่อสุ่มเก็บปัสสาวะ 10% แล้วนำมาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjedahl method (AOAC, 1990)

**3.5.6 การศึกษาเกี่ยวกับของเหลวในกระเพาะหมัก และการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยได้ (Volatile fatty acid)**

การเก็บของเหลวในกระเพาะหมัก (Collection of rumen fluid samples) เก็บช่วงสุดท้ายของการทดลองแต่ละ period โดยสุ่มเก็บของเหลวในกระเพาะหมัก (Rumen fluid) ใช้เครื่องมือ suction pump มีสายยางพลาสติกใส ผิวเรียบ มีขนาดเท่ากับ 1.27 เซนติเมตร (cm) ความยาวเท่ากับ 1 เมตร เพื่อดูดเอาของเหลวในกระเพาะหมักออกมาประมาณ 100 - 150 mL /ตัว เริ่มการสุ่มเก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0 ก่อนได้รับอาหารทดลอง และหลังได้รับอาหารทดลองชั่วโมงที่ 2 และ 4 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักแต่ละกลุ่มทดลอง วัดค่าความเป็นกรด-ด่างทันที โดยใช้เครื่อง pH meter ที่ได้รับการปรับ (Calibrate) ด้วยการใช้ buffers ที่มีค่าความเป็นกรด - ด่าง 7.0 และ 4.0 ก่อนวัดค่า pH หลังจากนั้นนำตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก 1 mm ใส่ในหลอดทดลองชนิดมีฝาปิด (Test tube with cap) ขนาด 25 mL บรรจุด้วย formaldehyde 10% ปริมาณ 9 mL เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง Scientific รุ่น Sorvall ST1R เก็บเฉพาะ

ส่วนของเหลวใสลงในขวดสีชา (vial with Markingspot) ขนาด 1.5 mL ปิดด้วยฝาจุกเกลียวเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับรอนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันระเหยได้ที่สำคัญ ได้แก่ Acetic acid Propionic acid และButyric acid ด้วยเครื่อง Agilent Technologies 7890A Gas chromatography system (GC) และวิเคราะห์ข้อมูลผ่านโปรแกรม GC 7890 Method VFA-WAX60M-FLOW15-MANAUL.M

**3.5.7 การวิเคราะห์แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($NH_3$-N) ในกระเพาะหมัก**

สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักปริมาตร 20 mL ใส่ในหลอดทดลองชนิดมีฝาปิด (Test tube with cap) ขนาด 25 mL บรรจุด้วย 6N HCL ปริมาตร 5 mL เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง Scientific รุ่น Sorvall ST1R เก็บเอาส่วนใส (Supernatant) ลงในขวดทดลองขนาด 25 mL ปิดด้วยฝาจุกเกลียว แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ $NH_3$-N โดยวิธีการกลั่นของ Bromner and Keeney (1965)

**3.5.8 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในกระแสเลือด (Blood urea nitrogen; BUN)**

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดแพะ เก็บช่วงสุดท้ายของการทดลองแต่ละ period โดยเริ่มต้นเก็บชั่วโมงที่ 0 ก่อนให้อาหารทดลอง และหลังให้อาหารทดลองชั่งโมงที่ 2 และ 4 ตามลำดับ ใส่ในหลอดสำหรับเก็บเลือดชนิดที่มี Serum/Heparin plasma EDTA Tube ขนาด 2 mL นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง Scientific รุ่น Sorvall ST1R จะได้ส่วนที่เรียกว่าพลาสมา (Plasma) แล้วเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส สำหรับรอนำไปวิเคราะห์ค่าปริมาณ BUN ด้วยวิธีการของ Kinetic (IFCC)

**3.5.9 การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระในกระแสเลือด**

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดแพะก่อนให้อาหารทดลองชั่วโมงที่ 0 และหลังให้อาหารทดลองชั่งโมงที่ 2 และ 4 ตามลำดับ ใส่ในหลอดสำหรับเก็บเลือดชนิดที่มี Serum/Heparin plasma EDTA Tube (จุกม่วง) ขนาด 2 mL 100/pack นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 3000 รอบ/นาที ด้วยเครื่อง Scientific รุ่น Sorvall ST1R เป็นเวลา 5 นาที จะได้ส่วนที่เรียกว่าพลาสมาแล้วเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนถึงการวิเคราะห์ DPPH (2,2-diphenyl-l-picrylhydrazyl) และ ABTS (3-ethybenzothialzoline-b-Sulfonic acid) ตามวิธีการของ Dawidowicz et al., (2021) โดยใช้เครื่อง Multiskan GO การคำนวณผ่านโปรแกรม SkanlT 4.1

**3.5.10 วิเคราะห์ข้อมูล**

ในการศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบละตินสแควร์ (Latin square design; LS) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลอง (Duncan’s new multiple-range test) และวิเคราะห์แนวโน้ม

ของการตอบสนองต่อระดับของการใช้ใบรวมก้านกัญชาที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยวิธี Polynomi trend analysis เมื่อข้อมูลในแต่ละกลุ่มการทดลองมีการแจกแจงแบบปกติ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS) เวอร์ชั่น 25

## 3.6 สถานที่วิจัย

สถานที่ทดลอง ณ ฟาร์มแพะแกะ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ อาคารศูนย์เครื่องมือ 10 อาคารศูนย์เครื่องมือ 14 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ห้องปฏิบัติการอาคารศูนย์เครื่องมือ 11 และโรงแปรรูปมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

## 3.7 ระยะเวลาการทดลอง

วันเริ่ม 15 มีนาคม พ.ศ. 2566 และวันสิ้นสุด 30 มิถุนายน พ.ศ. 2566