

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

##### การทดลองที่ 1 การผลิตอาหารผสมครบส่วนหมักในถุง 25 กิโลกรัม

###### การทำหมัก

ใช้หญ้าที่เปลี่ยนแปลงของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ที่อายุประมาณ 60 วัน ก่อนตัดทำการพ่นสารละลายกากน้ำตาลละลายน้ำ (1:1 โดยปริมาตร) ลงบนแปลงหญ้าในอัตรา 5% ของน้ำหนักหญ้าสดโดยใช้หัวฉีดพ่นตามแนวนอนซึ่งติดตั้งอยู่ท้ายรถแทรกเตอร์ จากนั้นใช้เครื่อง double chopper ตัดหญ้าให้มีความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร แล้วแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกนำไปใช้หมักกับอาหารชั้นทันที ส่วนชุดที่ 2 นำไปทำหญ้าหมักก่อนที่จะนำไปผสมกับอาหารชั้น การหมักหญ้าทำโดยบรรจุหญ้าดังกล่าวประมาณ 25 กิโลกรัมลงในถุง 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นถุงใยสังเคราะห์ ชั้นในเป็นถุงพลาสติกดำขนาด 36x45 นิ้วที่มัดก้นถุงแล้ว ทำการดูดอากาศภายในถุงออกให้หมด แล้วมัดปากถุงชั้นในด้วยเชือก ส่วนถุงชั้นนอกเย็บด้วยเครื่องเย็บกระสอบ ทำการหมักหญ้าไว้ในที่ร่มประมาณ 45 วัน ก่อนนำมาใช้หมักร่วมกับอาหารชั้นต่อไป

###### แผนการทดลอง

ทำการหมักอาหารผสมครบส่วน โดยไม่เสริมและเสริมกรดฟอร์มิก และกรดฟอร์มิกผสมฟอร์มาลิน (1:3 โดยปริมาตร) ในอัตรา 0.3% ของน้ำหนักอาหารผสมครบส่วน เพื่อดูผลของการเสริมสารเคมีที่มีต่อการหมักช่วงที่ 1 และช่วงที่ 2 โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือชุดที่ 1 ใช้หญ้าสด กับชุดที่ 2 ใช้หญ้าหมัก แต่ละชุดใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 อาหารผสมครบส่วนไม่เสริมสารเคมี (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 อาหารผสมครบส่วนเสริมกรดฟอร์มิก 0.3%

กลุ่มที่ 3 อาหารผสมครบส่วนเสริมกรดฟอร์มิกผสมฟอร์มาลิน 0.3%

ทำการคำนวณสูตรอาหารผสมครบส่วนโดยใช้โปรแกรม XRATION (สมคิด, 2542) ให้มีโภชนะตรงตามความต้องการของแม่โคที่มีน้ำหนัก 450 กิโลกรัมซึ่งให้แม่วันละ 20 กิโลกรัม มีไขมันนม 4%

โดยใช้มาตรฐาน NRC (1988) ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้คิดเป็นร้อยละในสภาพน้ำหนักสด ตลอดจนสูตรแร่ธาตุผสม 100 กิโลกรัม แสดงไว้ในตาราง 3.1

การหมักอาหารผสมครบส่วนทำโดยใช้หญ้าที่ปลูกกับอาหารชั้นในเครื่องผสมปูนซีเมนต์ กลุ่มที่ทำการเสริมกรดฟอร์มิกหรือฟอร์มิกผสมฟอร์มาลิน จะทดสอบเคมีตามปริมาณที่คำนวณไว้ลงในเครื่องขณะกำลังผสม เมื่อทำการผสมจนเข้ากันดีเป็นเวลาประมาณ 5 นาทีแล้ว เทออกบรรจุในถุง 2 ชั้น ปิดให้สนิทเช่นเดียวกับการทำหญ้าหมัก ทำการซึ่งน้ำหนักถุงที่บรรจุแล้วเป็นน้ำหนักเริ่มต้น หลังจากเก็บไว้ 45 วัน จึงชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อนำไปประเมินค่าการสูญเสียวัตถุแห้ง และเปิดถุงเพื่อประเมินคุณภาพโดยใช้ประสาทสัมผัส พร้อมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

ตาราง 3.1 ส่วนประกอบของอาหารผสมครบส่วน (ร้อยละของน้ำหนักสด) และส่วนผสมแร่ธาตุ

Table 3.1 Composition of total mixed ration (TMR; % fresh matter basis) and mineral mix (%)

Composition of TMR		In 100 kg mineral mix			
Ruzi grass/silage	70.66 kg	NaCl	40 kg	ZnO	300 g
Ground corn	13.78 kg	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	35.1 kg	MnO	300 g
Soybean meal	10.55 kg	CaCO <sub>3</sub>	13 kg	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	120 g
Rice bran	4.02 kg	MgO	5.8 kg	KIO <sub>3</sub>	13.5 g
Mineral mix	0.76 kg	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.9 kg	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.3 g
Limestone	0.23 kg	S	2.4 kg	Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Se.5H <sub>2</sub> O	2.6 g

### การประเมินคุณภาพ

ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนแต่ละถุง แล้วนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

1. ประเมินคุณภาพด้วยประสาทสัมผัส (Gross, 1982 อ้างโดยบุญเสริม, 2539)

2. หาค่าการสูญเสียวัตถุแห้งระหว่างการหมัก (dry matter loss) จากสูตร

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

3. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีการของ Bal *et al.* (1997) โดยนำตัวอย่าง 50 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นในโถปั่น (blender jar) เป็นเวลา 30 วินาที กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย glass electrode pH meter

4. วัดปริมาณกรดอินทรีย์โดยวิธีการกลั่น (Zimmer, 1966 อ้างโดย บุญล้อมและบุญเสริม, 2525)

5. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและเยื่อใยโดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984) และโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970)

#### การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

การทดลองที่ 2 การหาค่าการย่อยได้และประเมินค่าพลังงานของอาหารผสมครบส่วนโดยวิธี *in vitro* gas production และวิธี *in vivo*

การทดลองที่ 2.1 การคำนวณค่าพลังงานโดยวิธี *in vitro* gas production technique

#### แหล่งของน้ำกระเพาะรูเมนเพื่อการหมักในหลอดทดลอง

ใช้น้ำจากกระเพาะรูเมนของโคลูกผสมไฮลอสไตน์ฟรีเชียน ระดับสายเลือด 75% ที่อยู่ในระยะนมแห้งและไม่อุ้มท้อง จำนวน 3 ตัว ซึ่งได้ทำการเจาะกระเพาะรูเมนแล้ว เลี้ยงในของขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีที่ให้น้ำอัตโนมัติและวางอาหารอยู่ด้านหน้าตัวโค และมีแร่ธาตุก้อนไว้ให้โคได้เลียกินตลอดเวลา

#### อาหารทดลอง

โคได้รับอาหารผสมครบส่วนที่ประกอบด้วยหญ้าหูกผสมกับอาหารข้นและเสริมด้วยสารที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 คือกรดฟอร์มิก 0.3% ทำการผสมอาหารโดยใช้รถผสมอาหารแบบ reel และ auger ทำงานร่วมกัน ครั้งละ 500 กิโลกรัม สูตรอาหารและวิธีการบรรจุในถุงทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยเตรียมครั้งละ 100 ถุง (2.5 ตัน) และเนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวนี้เป็นสูตรสำหรับโคที่ให้นม 20 กิโลกรัม จึงมีส่วนส่วนของอาหารข้นสูง ประกอบกับใช้หญ้าหูกซึ่งมีสภาพเป็นกรดเป็นอาหารฐาน จึงต้องมีการผสมหญ้าแห้งและไซเดียมไปคาร์บอนเนตเข้าไปด้วยในอัตรา 1 และ 0.15 กิโลกรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ เพื่อป้องกันปัญหา acidosis ที่อาจเกิดขึ้นได้ ทำการผสมอาหารที่ให้โคดังกล่าวไปอบและบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรเพื่อนำไปใช้ในการทดลองวัดปริมาณแก๊ส

#### วิธีการทดลอง

ซึ่งตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนที่อบแห้งและบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ

200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพิเศษคล้ายเข็มฉีดยาขนาดใหญ่ ปลายหลอดมีสายยางสั้นๆ และมีคลิปสำหรับเปิด-ปิดได้ ทำตัวอย่างละ 3 ข้ำ ในการทำแต่ละครั้งมีหลอดที่ไม่ใส่ตัวอย่างอาหาร (blank) จำนวน 6 หลอด หลอดตัวอย่างอาหารชั้นและอาหารหยาบมาตรฐาน ชนิดละ 3 หลอดด้วย เพื่อใช้ในการปรับค่าแก๊ส เก็บน้ำจากกระเพาะรูเมนของโคลูกผสมไฮลด์ไดน์ฟรีเซียน จำนวน 3 ตัวมาผสมรวมกัน กรอง แล้วเติมสารละลายแร่ธาตุและบีฟเฟอร์ ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) นำหลอดดังกล่าวไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นที่รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อ่านปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นที่เวลา 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง นำค่าแก๊สสุทธิที่ 24 ชั่วโมงมาเข้าสมการ ทำนายการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุและพลังงาน ดังนี้

$$\text{DOM} = 8.89\text{Gb} + 0.448\text{XP} + 0.651\text{XA} + 149 \quad (\text{Menke } et \text{ al.}, 1979 \text{ อ้างโดย Close and Menke, 1986})$$

$$\text{ME}_r = 146\text{Gb} + 7\text{XP} + 22.4\text{XL} + 1242 \quad (\text{Menke } et \text{ al.}, 1979 \text{ อ้างโดย Close and Menke, 1986})$$

$$\text{NEL} = 0.6 [1 + 0.4 (q - 0.57)] \text{ME} \quad (\text{Close and Menke, 1986})$$

เมื่อ  $q = \text{ME}/\text{GE}$  ค่า GE หาโดยใช้ Adiabatic bomb calorimeter

XP = Crude protein XA = Ash Gb = gas volume XL = Ether extract

## การทดลองที่ 2.2 การคำนวณค่าพลังงานจากการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*in vivo*)

### สัตว์ทดลองและคอกทดลอง

ใช้โคลูกผสมไฮลด์ไดน์ฟรีเซียน ระดับสายเลือด 75% ที่อยู่ในระยะนมแห้ง ไม่อุ้มท้องจำนวน 4 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 418 กิโลกรัม เลี้ยงในช่องขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีที่ให้น้ำอัตโนมัติและวางอาหารอยู่ด้านหน้าตัวโค และมีแร่ธาตุก้อนไว้ให้โคได้เลี้ยกินตลอดเวลา ก่อนทำการทดลองถ่ายพยาธิโดยฉีดยา Ivomec® ในอัตรา 9 ซีซีต่อตัวและฉีดวิตามิน AD<sub>3</sub>E ในอัตรา 5 ซีซีต่อน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัม ทำการชั่งน้ำหนักก่อนและหลังการทดลองติดต่อกัน 3 วัน โดยงดอาหารมื่อเย็นก่อนที่จะชั่งน้ำหนักในเช้าวันรุ่งขึ้น

### อาหารทดลอง

ใช้อาหารเช่นเดียวกันกับการทดลอง 2.1 ซึ่งประกอบด้วยหญ้าซีหมัก อาหารชั้น สารเสริมเพื่อถนอมคุณภาพและวัสดุเสริมป้องกันการเกิด acidosis คือ หญ้าแห้งและโซเดียมไบคาร์บอเนต

### วิธีการทดลอง

ให้อาหารวันละ 3 เวลา คือ 7:00, 11:00 และ 15:00 น. โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง คือ

1. ช่วงปรับตัว (preliminary period) ใช้เวลาประมาณ 28 วัน โดย 14 วันแรกทำการปรับสัดส่วนอาหารโดยเพิ่มอาหารทดลองขึ้นเรื่อยๆ และลดอาหารเก่าที่โคเคยได้รับ จนในที่สุดให้อาหารทดลองทั้งหมดอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) เก็บข้อมูลปริมาณการกินได้ของโคในวันที่ 15-21 ต่อมาในวันที่ 21-28 ปรับอาหารลงเหลือเพียง 90% ของปริมาณที่กินได้ เพื่อให้สัตว์สามารถกินอาหารได้หมด พร้อมทั้งสวมอุปกรณ์พิเศษสำหรับแยกเก็บปัสสาวะไม่ให้ปะปนกับมูลเพื่อให้สัตว์เกิดความเคยชิน

2. ช่วงเก็บข้อมูล (collection period) ใช้เวลา 5 วัน คือในช่วงวันที่ 29-33 ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่โคกิน อาหารเหลือ น้ำหนักมูล และปัสสาวะที่โคขับถ่ายในแต่ละวัน วันละ 2 เวลา คือ 8:00 และ 16:00 น. กุ้งที่รองรับปัสสาวะบรรจุกรดซัลฟูริกเข้มข้น 18N ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เพื่อรักษาไนโตรเจนในปัสสาวะและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ทำการสุ่มเก็บอาหารที่ให้และที่เหลือ สุ่มเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะในอัตรา 1% และ 5% ตามลำดับ แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิประมาณ -10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

#### การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการคำนวณ

นำตัวอย่างอาหาร มูล และปัสสาวะที่แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ดังนี้

1. องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างอาหารที่ให้ อาหารเหลือและมูลโดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984) และวิเคราะห์หาเยื่อใยโดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970)
2. ค่าพลังงานรวมในอาหารและมูลโดยใช้ Adiabatic bomb calorimeter
3. ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างมูลสดและปัสสาวะ หาโดยวิธี AOAC (1984)
4. สมดุลไนโตรเจน (nitrogen balance) คำนวณจากสูตร  
สมดุลไนโตรเจน (กรัม/วัน) = ไนโตรเจนที่กิน (กรัม) - ไนโตรเจนในมูล (กรัม) - ไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม)
5. ค่าการย่อยได้ของโภชนะหาได้ ดังนี้

$$\text{การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)} - \text{โภชนะในมูล (กรัม)}}{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)}} \times 100$$

6. ค่าโภชนะย่อยได้ทั้งหมด (Total Digestible Nutrient, TDN) หา ดังนี้

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

เมื่อ DCP, DNDF, DNFC และ DEE คือปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ของโปรตีน, NDF, NFC และไขมัน ตามลำดับ



7. คำนวณค่า DE, ME และ NE<sub>L</sub> โดยใช้ค่า TDN ตามสมการของ NRC (1988) ดังนี้

$$DE \text{ (Mcal/kg DM)} = 0.04409 \times \%TDN$$

$$ME \text{ (Mcal/kg DM)} = -0.45 + (0.04453 \times \%TDN)$$

$$NE_L \text{ (Mcal/kg DM)} = -0.12 + (0.0245 \times \%TDN)$$

หรือคำนวณค่า ME และ NE<sub>L</sub> โดยอาศัยสมการของ NRC (1988) ดังนี้

$$ME \text{ (Mcal/kg DM)} = 0.82 \times DE$$

$$NE_L \text{ (Mcal/kg DM)} = (0.556 \times DE) - 0.12$$

หมายเหตุ: คือสูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (1988)

การคำนวณค่าพลังงานของอาหารผสมครบส่วนใช้ค่าที่ได้จากการหาโดยวิธี gas production technique และค่าจากการคำนวณโดยใช้ตารางมาตรฐานของ NRC (1988) รวมทั้งจากการหาในตัวสัตว์มาพัฒนาาร่วมกันเพื่อหาค่าที่มีความเหมาะสมที่สุด

### การทดลองที่ 3 ผลของอาหารผสมครบส่วนที่มีหญ้าหมักเป็นอาหารหยابหลักต่อสมรรถภาพการผลิตของโครีดนม

#### สัตว์ทดลองและคอกทดลอง

ใช้โคลูกผสมไฮลด์สไตน์ฟรีเซียน ระดับสายเลือด 87.5% จำนวน 6 ตัว น้ำหนักประมาณ 479 ± 44.95 กิโลกรัม จำนวนวันที่ให้นม 140 ± 37.09 วัน ให้นมเฉลี่ย 19.64 ± 2.76 กิโลกรัม เลี้ยงในของขังเดี่ยวผูกยืนโรง มีที่ให้น้ำอัตโนมัติและรางอาหารอยู่ด้านหน้าตัวโค บริเวณที่ให้โคยืนรองด้วยผ้ายางสีดำหนาประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อป้องกันการเกิดบาดแผลบริเวณขาของโคเนื่องจากการลุกยืนหรือนอน

#### อาหารทดลอง

ใช้หญ้าที่อายุประมาณ 60 วันที่หมักร่วมกับสารละลายกากน้ำตาล 5% ของน้ำหนักหญ้าสดในหลุมหมักแบบ bunker silo ความจุประมาณ 200 ตัน นำหญ้าที่หมักมาผสมกับอาหารข้นโซเดียมไบคาร์บอเนตและหญ้าที่แห้งในรูปอาหารผสมครบส่วนก่อนให้โคกิน หญ้าแห้งที่ใช้ทดลองเป็นหญ้าที่ผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารสำรองตามปกติของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ โดยหันให้เป็นท่อนยาวประมาณ 2 นิ้วก่อนใช้ผสมอาหาร สูตรอาหารคำนวณโดยใช้โปรแกรม XRATION (สมคิด, 2542) ให้มีโภชนะเพียงพอสำหรับโคน้ำหนักตัวประมาณ 480 กก. อายุประมาณ 5 ปี ให้นมในระยะที่ 3 วันละ 20 กก. และมีไขมันนม 4% ซึ่งเป็นสูตรควบคุม (กลุ่ม 1) สำหรับกลุ่มที่ 2 และ 3 มีการเสริมโซเดียมไบคาร์บอเนต 200 กรัม/วัน นอกจากนี้ในสูตรที่ 3 ยังมีการเพิ่มหญ้าแห้งอีก 2

กิโลกรัม พร้อมทั้งลดหญ้าหมักลง 8 กิโลกรัม เหลือเพียง 11 กิโลกรัม ดังแสดงในตาราง 3.2 อาหารทั้ง 3 สูตรนี้มีสัดส่วนของอาหารข้น : อาหารหยาบ ประมาณ 67 : 33 การที่กำหนดให้สูตรอาหารผสมครบถ้วนมีสัดส่วนของอาหารข้นสูงนั้นเพื่อจำลองสภาพการณ์ในกรณีของโคที่ให้นมสูง

#### แผนการทดลอง

เนื่องจากไม่สามารถจัดหาสัตว์ทดลองได้เพียงพอสำหรับแผนการทดลองอื่น ซึ่งต้องใช้จำนวนเข้ามา จึงได้ใช้แผนการทดลองแบบสลับ (Change over design) และเนื่องจากไม่สามารถจัดระยะพักระหว่างแต่ละทรีทเมนต์ได้เพราะโคต้องรีดนมต่อเนื่อง จึงได้วางแผนสำรวจผลตกค้าง (residual effect) โดยวางทรีทเมนต์สลับกันภายใน 2 สแควร์ (Balanced design) (จรัญ, 2540) โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะๆละ 17 วัน โดยใช้โคนมสแควร์ละ 3 ตัว รวม 6 ตัว การจัดกลุ่มการทดลองแสดงในตาราง 3.3

ตาราง 3.2 ส่วนประกอบของอาหารผสมครบถ้วน (กิโลกรัมสด/ตัว/วัน) และอาหารข้น

Table 3.2 Composition of total mixed ration (kg as fed basis/head/day) and concentrate

Composition of TMR	TMR1	TMR2	TMR3	Concentrate composition (%)	
Ruzi silage	19.00	19.00	11.00	Soybean meal	20.15
Ruzi hay	1.00	1.00	3.00	Cotton seed	13.08
Concentrate	13.00	13.00	13.00	Rice bran	9.00
NaHCO <sub>3</sub>	-	0.20	0.20	Ground corn	50.46
Total fresh weight	33.00	33.20	27.20	Fish meal	5.00
Total dried weight	16.41	16.35	16.44	Limestone	0.08
Roughage : Concentrate ratio	34:66	34:66	32:68	Mineral mix	2.23
				Vitamin A,D,E (g)	20.85
				Total	100.00

<sup>1/</sup> mineral mixture was the same as experiment 1.

ตาราง 3.3 การจัดกลุ่มโคทดลอง

Table 3.3 Treatment arrangement

	Cow no.1	Cow no.2	Cow no.3	Cow no.4	Cow no.5	Cow no.6
Period 1	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Period 2	T2	T3	T1	T3	T1	T2
Period 3	T3	T1	T2	T2	T3	T1

ให้อาหารโคนมตามแผนการทดลอง โดยแบ่งให้ 2 เวลา คือ 8:00 น. และ 16:00 น. และให้ในรูปอาหารผสมครบส่วน คือผสมหญ้าหมัก หญ้าแห้ง และอาหารข้นให้เข้ากันก่อนให้โคกินในแต่ละมื้อ โดยผสมอาหารเป็นรายตัว ทำการเก็บอาหารเหลือออกวันละครั้งในช่วงเช้าก่อนให้อาหาร การรีดนมใช้เครื่องแบบ bucket วันละ 2 เวลา คือ 6:00 และ 15:30 น. ทำการทดลอง 3 ระยะๆ ละ 17 วัน โดย 7 วันแรกของแต่ละคาบเป็นการปรับให้สัตว์คุ้นเคยกับอาหารใหม่ ส่วน 10 วันหลังเป็นช่วงเก็บข้อมูลปริมาณน้ำนม และปริมาณอาหารที่กินได้ สุ่มเก็บตัวอย่างหญ้าหมัก อาหารที่ให้ อาหารเหลือ ไปอบหาค่าวัตถุแห้งทุกวันเพื่อนำไปคำนวณค่าวัตถุแห้งที่โคกินได้ และแบ่งอีกส่วนไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมี สำหรับวัตถุดิบอื่นๆ เช่น ข้าวโพดบด กากถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย รำ และปลาป่น ทำการสุ่มก่อนที่จะนำมาผสมอาหารข้นในแต่ละระยะ รวมทั้งหญ้าแห้งจะนำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี นอกจากนี้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมระยะละ 5 วัน โดยสุ่มเก็บช่วงเช้าและเย็นในอัตรา 1% ของปริมาณน้ำนม แล้วนำมารวมกัน ใส่ sodium azide ในอัตรา 0.1% เพื่อรักษาสภาพนม เก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

#### การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างอาหารที่ให้ อาหารที่เหลือ หญ้าหมักที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งมาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบหาค่าวัตถุแห้ง รวมทั้งตัวอย่างหญ้าแห้ง และอาหารข้นด้วย หลังจากนั้นบดตัวอย่างต่างๆ ผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและเชื้อใย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 สำหรับตัวอย่างหญ้าหมักนำไปหาค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดอินทรีย์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของนมทำโดยใช้เครื่อง Milkoscan 133 V 3.9 GB

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลอง Balanced design และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Scheffe (Scheffe's multiple contrasts)