

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อปริมาณเบต้าแคโรทีน มิโมซิน และคุณภาพของกระถินหมักที่อายุการหมักต่าง ๆ

รับซื้อใบกระถินยักษ์สายพันธุ์ชวลวอเตอร์สดที่รวมกันใบย่อย (whole compound leaves) จากเกษตรกรในพื้นที่ตำบลยุหว่า อำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ในราคา 1.50 บาทต่อกิโลกรัมสด โดยเกษตรกรจะเก็บในตอนเช้า แล้วนำมาขายในวันเดียวกัน กำหนดให้เกษตรกรนำมาส่งทันที หลังจากเก็บในช่วงก่อนเที่ยงวัน และช่วงบ่าย เพื่อป้องกันใบกระถินเน่า หรือตายหนึ่ง ด้วยเหตุที่ใบกระถินสดมีการเน่าเสียง่ายและปริมาณที่รับซื้อในแต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ จึงจำเป็นที่จะต้องทำการหั่นและหมักเป็นคราวไป ดังนั้นจึงต้องสุ่มเก็บตัวอย่างใบกระถินสดแต่ละชุด รำละเอียดแต่ละกระสอบที่ใช้ และกระถินผสมรำก่อนการหมัก ในแต่ละครั้งแล้วนำตัวอย่างแต่ละชนิดของทุกชุดมาผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการสุ่มย่อยเพื่อเก็บตัวอย่างไว้วิเคราะห์ ชนิดละ 1 ตัวอย่าง

หั่นใบกระถินด้วยเครื่องหั่นให้มีขนาดชิ้น 2-3 เซนติเมตร ซึ่งใบกระถินที่หั่นแล้ว 20 กิโลกรัม รำละเอียด 4 กิโลกรัม น้ำประมาณ 2 กิโลกรัม ในกรณีที่ใบกระถินมีความชื้นต่ำ หรือมีค่าวัตถุแห้งมากกว่า 35% เพิ่มน้ำเป็น 2 เท่า เพื่อให้รำจับตัวกับใบกระถิน แล้วจึงผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมปูนซีเมนต์ เพื่อให้มีการคลุกเคล้าเข้ากันอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นเทออกจากเครื่อง นำไปบรรจุลงในถุง 2 ชั้น ๆ ในเป็นถุงพลาสติกดำที่มัดกันแล้ว ชั้นนอกเป็นถุงใยสังเคราะห์ อดให้แน่น บรรจุถุงละ 26 กิโลกรัม จำนวน 30 ถุง ตู้อากาศภายในถุงดำด้วยปั๊มสุญญากาศออกให้หมดมัดด้วยเชือกและเย็บปากถุงชั้นนอกด้วยเครื่องเย็บกระสอบ จากนั้นเก็บไว้เป็นเวลา 21, 51, 81, 111 วัน จึงเปิดถุงออกเพื่อประเมินคุณภาพ

๐ ประเมินคุณภาพของใบกระถินหมัก ทำการสุ่มกระถินหมักครั้งละ 5 ถุง แล้วทำการศึกษา ดังนี้

1. ประเมินลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ กลิ่น สี และลักษณะโครงสร้าง ด้วยวิธีการที่เรียงเรียงโดย บุญล้อม และ บุญเสริม (2525)
2. เปอร์เซนต์การสูญเสียวัตถุแห้ง (% dry matter loss) จากกระบวนการหมัก ดังนี้

$$DM \text{ loss } (\%) = \frac{(\%DM \text{ ก่อนหมัก} \times \text{นน.ก่อนหมัก}) - (\%DM \text{ หลังหมัก} \times \text{นน.หลังหมัก})}{(\%DM \text{ ก่อนหมัก} \times \text{นน.ก่อนหมัก})} \times 100$$

3. ประเมินคุณภาพทางเคมีโดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีการของ Bal *et al.* (1997)

4. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของโดยวิธี Proximate analysis (AOAC, 1984) และ โดยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970)
5. วิเคราะห์ปริมาณ β - carotene (Schneider, 1995)
6. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารมิโมซิน ก่อนและหลังการหมัก ตามวิธีการของ Hegarty *et al.* (1964) รายละเอียดแสดงไว้ใน ภาคผนวก 1
6. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test

การทดลองที่ 2 ประเมินค่าพลังงาน และการย่อยได้ของกระถินหมัก

□ ทดลองในสัตว์ (in vivo)

กระถินหมักที่ใช้ในการทดลองที่ 2 เป็นกระถินที่หมักในคราวเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ทำการผสมครั้งละประมาณ 500 กิโลกรัม โดยใช้คนช่วยกันผสม เพราะสามารถทำได้รวดเร็วกว่าการใช้เครื่องผสมปูน หลังจากผสมให้สัดส่วนต่าง ๆ เข้ากันดีแล้วทำการบรรจุลงถุงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำจำนวน 80 ถุง (2 ตัน) จากนั้นขนย้ายถุงกระถินที่หมักแล้วไปเก็บไว้ยังบริเวณคอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์

นำใบกระถินที่หมักไว้เป็นเวลา ประมาณ 90 วัน มาทดลองเลี้ยงโคลูกผสม Holstein Friesian 85% จำนวน 4 ตัว ที่อยู่ในระยะนมแห้งแต่ไม่อุ้มท้อง น้ำหนักเฉลี่ย 480 กิโลกรัม ก่อนทดลองทำการถ่ายพยาธิด้วยยา Ivomec[®] ในอัตรา 9 cc ต่อตัวและฉีดวิตามิน AD₃E ในอัตรา 5 cc ต่อน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัม การชั่งน้ำหนักในตอนเช้าทำโดยอดอาหารสัตว์มือเย็นตั้งแต่เวลา 16.00-8.00 น. ก่อนชั่งติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ทั้ง ก่อน และหลังการทดลอง

คอกทดลองเป็นคอกขังเดี่ยว มีที่ให้น้ำอัตโนมัติและรางอาหารอยู่ด้านหน้าของตัวโค มีก้อนแร่ธาตุให้โคได้กินตลอดเวลา นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุผงที่ผสมขึ้นเอง ให้ประมาณวันละ 80 กรัมต่อตัวต่อวัน โดยแบ่งโรยบนอาหารที่ให้ในแต่ละมื้อ สูตรแร่ธาตุผงมีดังนี้

คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO ₄)	148 กรัม	ไดแคลเซียมฟอสเฟต (Ca ₂ PO ₄)	30 กิโลกรัม
เกลือป่น (NaCl)	6.4 กิโลกรัม	แมงกานีสออกไซด์ (MnO)	28 กรัม
แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO)	1.8 กิโลกรัม	โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl ₂ ·H ₂ O)	1.6 กรัม
ซัลเฟอร์ (S)	1.4 กิโลกรัม	โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	0.8 กรัม
ซิงค์ออกไซด์ (ZnO)	220 กรัม	โซเดียมซีลีไนท์ (Na ₂ Se)	1.6 กรัม

ในการทดลองหาค่าการย่อยได้ของโภชนะในกระถินหมัก แบ่งการทดลอง เป็น 2 ช่วง คือ

1. ช่วงปรับตัว (preliminary period) ใช้เวลาประมาณ 21 วัน เริ่มหลังจากชั่งน้ำหนักสัตว์แล้วจึงปรับให้สัตว์คุ้นเคยกับการกินกระถินหมัก โดยลดปริมาณอาหารปกติที่โคเคยกิน คือ

หญ้าสด หญ้าแห้ง ในแต่ละวันลงทีละน้อย แล้วเพิ่มปริมาณกระถินหมักขึ้นตามลำดับ จนในที่สุดให้โคกินกระถินหมักอย่างเดียว โดยในแต่ละมื้อผสมสารบัฟเฟอร์ คือ โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 1% ของน้ำหนักสด และแร่ธาตุผง 20 กรัมต่อตัวต่อมื้อ ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง คือที่เวลา 8.00, 11.00, 14.00 และ 17.00 น. เนื่องจากกระถินเป็นพืชตระกูลถั่วอาจมีผลทำให้สัตว์เกิดอาการท้องอืด (bloat) ได้ง่ายเมื่อให้กินเป็นอาหารเดี่ยวและให้เป็นปริมาณมาก จึงต้องสังเกตอาการของโคหลังกินกระถินหมักอย่างใกล้ชิด บันทึกปริมาณอาหารที่กินของโคแต่ละตัวทุกวัน และกำหนดปริมาณอาหารที่ให้เป็น 1.5 % วัตถุแห้งต่อน้ำหนักตัวต่อวันเพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดจากอาการท้องอืด และ/หรือ จากพิษของมิโมซินที่อาจหลงเหลืออยู่ในกระถินหมักด้วย

2. ช่วงเก็บข้อมูล (collection period) ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่โคได้รับ อาหารเหลือน้ำหนักมูล และปริมาณปัสสาวะ ที่ขับถ่ายในแต่ละวันของโคทุกตัว วันละ 2 เวลา คือ 8.00 และ 17.00 น. เป็นเวลา 5 วัน ถูกรองรับปัสสาวะบรรจุกรด H_2SO_4 เข้มข้น 18 N ครั้งละ 100 ml เพื่อรักษาปริมาณไนโตรเจนในปัสสาวะ และช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ให้ และที่เหลือ สุ่มเก็บตัวอย่างมูล และปัสสาวะ ในอัตรา 1% และ 5% ตามลำดับ นำตัวอย่างทั้งหมด ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ ประมาณ -10°C เมื่อเสร็จสิ้นการเก็บข้อมูล นำตัวอย่างที่เก็บไว้แต่ละวันของโคแต่ละตัว มารวมกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการต่อไป

หลังช่วงเก็บข้อมูล มีการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของกระเพาะรูเมนติดต่อกัน 2 วัน ๆ ละ 4 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ คือ ก่อนให้อาหารมื้อเช้า (8.00 น.) และหลังจากนั้นทุก ๆ 2 ชั่วโมง (10.00, 12.00, 14.00 และ 16.00 น.) โดยสอดมือเข้าไปในท่อที่ฝังตรงกระเพาะรูเมนล้วงเศษอาหารออกมาบีบส่วนที่เป็นน้ำลงในภาชนะขนาด 30 ml ซึ่งแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 39°C แล้ววัดทันทีด้วย pH meter แบบพกพา ยี่ห้อ pH Scan BNC™ ซึ่งมีค่าความถูกต้อง ± 0.1 และ ปรับความเที่ยงตรงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4 และ 7 ไว้แล้ว

นำตัวอย่างอาหารที่ใช้เลี้ยงโค อาหารเหลือ และมูล มาทำการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. วิเคราะห์ ค่า Proximate (AOAC, 1984) Detergent fiber (Goering and Van Soest, 1970) และพลังงานรวม โดยใช้ Bomb calorimeter แบบ adiabatic โดยวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารที่ให้กิน อาหารเหลือ และมูล
2. วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง มูลสด และปัสสาวะ (AOAC, 1984)
3. คำนวณค่าการย่อยได้ขององค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

$$\% \text{ Digestion coefficient} = \frac{\text{Nutrient intake} - \text{Nutrient excreted}}{\text{Nutrient intake}} \times 100$$

4. คำนวณค่าโภชนะย่อยได้ทั้งหมด (total digestible nutrient, TDN) ดังนี้

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

เมื่อ DCP, DNDF, DNFC และ DEE คือ ปริมาณโภชนะที่ย่อยได้ ของ โปรตีน, NDF, NFC (คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เยื่อใย) และไขมัน ตามลำดับ

5. สมดุลไนโตรเจน (กรัม/วัน) = ไนโตรเจนที่กิน (กรัม) - ไนโตรเจนในมูล (กรัม) - ไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม)

6. คำนวณค่า DE, ME และ NEL โดยใช้ค่า TDN ตามสมการของ NRC (1988) ดังนี้

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

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

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

หรือคำนวณจาก ค่า DE โดยใช้สูตร ดังนี้

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

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

* สูตรที่ดัดแปลงจาก NRC (1988)

- ทดลองหาค่าการย่อยสลายของวัตถุดิบ โดยวิธี ใช้ถุงในล่อน (*in sacco*) ตามวิธีการของ Ørskov *et al.* (1988)

นำค่า % DM disappearance ที่ชั่วโมงต่าง ๆ เข้าโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY เพื่อคำนวณหาค่าการย่อยสลาย โดยใช้สมการ $P = a + b(1 - e^{-ct})$

เมื่อ P = โภชนะที่หายไปที่เวลา t (degradation at time t)

A = ส่วนที่ละลายได้ (immediately soluble material, %)

B = ส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถหมักย่อยได้ (insoluble but potentially fermentable material, %)

a = เส้นกราฟที่ลากตัดแกน y

b = $(A+B) - a$

c = อัตราการย่อยสลาย (degradation rate, %/h)

L = ระยะเวลาที่รอให้จุลินทรีย์เข้าย่อยสลายโภชนะส่วนที่ไม่ละลาย

- ทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดยวิธีวัดปริมาตรแก๊ส ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988)

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลการใช้กระถินหมักทดแทนอาหารชั้น เพื่อเลี้ยงโคนม

□ สัตว์ทดลอง แผนการทดลอง และสูตรอาหารชั้น

ใช้โคลูกผสมที่มีสายเลือด Holstein Friesian 87.5 % จำนวน 15 ตัว ซึ่งมีค่าเฉลี่ยต่าง ๆ ดังนี้ คือ น้ำหนักตัว 503 ± 76 กิโลกรัม, อายุ 6 ± 2 ปี, จำนวนวันที่ให้นม 137 ± 23 วัน และมีผลผลิตน้ำนม 17 ± 5 กิโลกรัม แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว แต่ละกลุ่มมีปริมาณน้ำนมก่อนการทดลองใกล้เคียงกัน คือ 17 ± 4.2 กิโลกรัม นำค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำนมแต่ละกลุ่มก่อนการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) จากนั้นให้โคแต่ละกลุ่มได้รับอาหารชั้นที่มีปริมาณกระถินหมัก 0, 25 และ 50 % ของวัตถุดิบแห้ง ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD

การคำนวณสูตรอาหารใช้ค่าพลังงานในระบบ TDN ซึ่งค่า TDN ของวัตถุดิบที่ใช้ประกอบสูตรอาหารนั้นอาศัยข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้ ในกรณีที่วัตถุดิบนั้นไม่มีค่าดังกล่าวได้ทำการคำนวณโดยอาศัยองค์ประกอบทางเคมี ด้วยสมการที่แนะนำโดย Keard (1982) ดังนี้ คือ

$$\text{TDN of dry roughage (\%DM)} = -17.2649 + 1.2120 (\%CP) + 0.8352 (\%NFE) + 2.4637 (\%EE) + 0.4475 (\%CF)$$

$$\text{TDN of energy feed (\%DM)} = 40.2625 + 0.1969 (\%CP) + 0.4228 (\%NFE) + 1.1(\%EE)-0.1379(\%CF)$$

$$\text{TDN of protein supplement (\%DM)} = 40.3227 + 0.5398 (\%CP) + 0.4448 (\%NFE) + 1.4218(\%EE)-0.7007(\%CF)$$

ก่อนการทดลองได้นำค่าเฉลี่ยข้อมูลที่ได้กล่าวมาแล้วของโคที่คัดเลือกไว้มาคำนวณสูตรอาหารผสมครบส่วน (TMR) ให้มีโภชนะเพียงพอตามที่ NRC (1988) แนะนำ โดยใช้โปรแกรม Xration (สมคิด, 2542) ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวสำหรับโคกลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) มีส่วนของอาหารชั้นที่คิดเป็นร้อยละ ดังแสดงในตาราง 3.1 มีหญ้าที่หมัก ผสมหญ้าที่แห้ง 10% นน.สดของหญ้าหมัก เป็นอาหารหยาบ

ตาราง 3.1 ส่วนประกอบของอาหารข้น (ร้อยละของน้ำหนักสด) ราคา และส่วนผสมของแร่ธาตุ

Table 3.1 Composition of concentrate, price and minerals mixed.

Composition of concentrate	% of fresh basis	Price (bath/kg)	
Ground corn	31.87	5.00	
Soybean meal	30.49	10.00	
Rice bran	12.48	4.00	
Whole cotton seed	20.79	5.00	
Mineral mixed	3.74	15.00	
Vitamin ADE	0.000363	500.00	
Calcium carbonate (CaCO ₃)	0.62	1.00	
รวม	100	6.77 (bath/kg)	
แร่ธาตุมีส่วนผสม ดังนี้			
<u>Mineral</u>	<u>g/kg</u>	<u>Mineral</u>	<u>g/kg</u>
NaCl	400	ZnO	3
Ca ₃ (PO ₄) ₂	350	MnO	3
CaCO ₃	130	CuSO ₄	1
MgO	58	KIO ₃	0.11
S	24	CoSO ₄	0.029
Na ₂ SO ₄	30	Na ₂ SeO ₃	0.029

จากนั้นคำนวณสูตรที่ 2 โดยในสูตรมีปริมาณอาหารข้น 70% ของปริมาณอาหารข้นที่โคต้องการ โดยใช้อาหารข้นสูตรเดียวกับสูตรควบคุม จากนั้นปรับโภชนะที่ขาดด้วยกระถินหมักจนได้โภชนะตามที่ต้องการเท่ากับ 25% ของวัตถุดิบ หรือใช้กระถินหมักทดแทนอาหารข้น 30% แต่เนื่องจากกระถินหมักมีโปรตีนสูงแต่มีพลังงานต่ำกว่าอาหารข้น จึงต้องใช้ข้าวโพดบดมาช่วยในการปรับสูตรด้วย สูตรที่ 3 ทำเช่นเดียวกับสูตรที่ 2 แต่ใช้อาหารข้นในปริมาณ 40 % ของปริมาณอาหารข้นที่โคต้องการ และมีปริมาณกระถินหมักเท่ากับ 50% ของวัตถุดิบ หรือใช้กระถินหมักทดแทนอาหารข้น 60% ซึ่งสูตรอาหารผสมครบส่วนทั้ง 3 สูตร แสดงไว้ในตาราง 3.2 ส่วนรายละเอียดของตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนที่ใช้สำหรับโคทั้ง 3 กลุ่ม แสดงไว้ใน ภาคผนวก 3

ตาราง 3.2 ส่วนประกอบของอาหารผสมครบส่วนทั้ง 3 สูตร (กิโลกรัมสด/วัน)

Table 3.2 Composition of total mixed ration (kg as fed/day)

Level of LS in conc. mixture (DM basis)	0%	25%	50%
Level of LS in conc. being substituted	0%	30%	60%
Ground corn	2.82	3.17	2.91
Soybean meal	2.70	1.88	1.08
Rice bran	1.11	0.77	0.44
Whole cotton seed	1.84	1.28	0.74
Mineral mixed	0.33	0.23	0.13
Vitamin	0.01	0.01	0.001
CaCO ₃	0.05	0.04	0.02
Leucaena silage	0	6.43	12.57
<i>Total of concentrate</i>	<i>8.86</i>	<i>13.81</i>	<i>17.89</i>
Ruzi silage	18.20	18.10	17.52
Ruzi hay	1.82	1.81	1.75
<i>Total of roughage</i>	<i>20.02</i>	<i>19.91</i>	<i>19.27</i>
<i>Total diet</i>	<i>28.88</i>	<i>33.72</i>	<i>37.16</i>

□ สถานที่ คอกทดลอง และการจัดการ

ทำการทดลองที่คอกทดลองของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อ.สันป่าตอง โดยโคทั้ง 15 ตัว ถูกเลี้ยงรวมอยู่ในคอกเดียวกันโดยมีได้ขังเดี่ยว เนื่องจากข้อจำกัดในแง่ของคอกทดลอง ดังนั้นจึงมีอุปสรรคในการทราบปริมาณอาหารหยาบที่โคกินเป็นรายตัว แต่ในกรณีของอาหารข้นไม่เป็นปัญหาเพราะได้จัดการให้สัญญาณลักษณะที่แตกต่างกันสำหรับโคแต่ละกลุ่ม ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการให้อาหารและการบันทึกข้อมูล ลักษณะของคอกเป็นโรงเรือนขนาดใหญ่ที่เปิดโล่งทั้ง 4 ด้าน โดยมีพื้นที่สำหรับคอกนอน ที่กินอาหาร น้ำ และแร่ธาตุก้อน อยู่ภายใต้หลังคาเดียวกัน พื้นเป็นซีเมนต์ มีตะแกรงเหล็กในบริเวณที่โคยืนกินอาหาร เพื่อระบายของเสียลงใต้พื้นคอก ส่วนด้านหลังของคอกเป็นพื้นที่สำหรับให้โคได้เดินออกกำลังกาย และได้รับแสงแดด ที่กินน้ำเป็นอ่างน้ำขนาดใหญ่ 1 อ่าง มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ากว้าง x ยาว x ลึก ประมาณ 1 x 5 x 1 เมตร มีวาล์วเปิด - ปิด ส่วนอาหารให้ด้านนอกของคอก โดยให้โคยืนเฉพาะส่วนหัวและคอออกไปกิน บริเวณที่ให้อาหารมีไม้กั้นแยกเป็นรายตัว เพื่อป้องกันการแย่งกันกิน ไม้ที่กั้นนี้สามารถยกออกเพื่อทำความสะอาดบริเวณที่ให้อาหารได้ ในการให้อาหารแต่ละมื้อจะลือคอกโคให้ยืนอยู่กับที่ ให้โคได้รับอาหารข้น หรืออาหารข้นที่คลุกเคล้ากับ

กระถินหมัก และเสริมด้วยสารปรับบัฟเฟอร์ คือ โซเดียมไบคาร์บอเนต (1 % น้ำหนักสดของอาหารชั้น) ก่อน เมื่อหมดแล้วจึงให้อาหารหยาบกินต่อไปอย่างเต็มที่จากนั้นทำการปลดล็อก โคมีโอกาสเข้ามากินอาหารหยาบในรางได้ตลอดเวลา

ทำการรีดนมด้วยเครื่องรีด ระบบ pipeline วันละ 2 ครั้ง ที่เวลา 5.00 และ 16.00 น. สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมจากถังที่เชื่อมต่อกับบีมีรีดน้ำนม ทั้งก่อน และระหว่างการทดลอง โดยแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างในช่วงเช้า และเย็นแยกกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบน้ำนมโดยเครื่อง milkoscan

ทำการเจาะเลือดในตอนเช้าหลังกินอาหารประมาณ 1 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงที่สะดวกต่อการเจาะมากที่สุด โดยเจาะบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ตัวละ 10 มิลลิลิตร ทั้งก่อน และหลังทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนในซีรัม (serum) ด้วยวิธีการของ Neeld and Peasson (1963) รายละเอียดแสดงไว้ใน ภาคผนวก 2

□ วิธีการทดลอง ในการทดลองครั้งนี้ แบ่ง เป็น 2 ช่วง คือ

1. ช่วงปรับตัว (preliminary period) ใช้เวลาประมาณ 1 เดือน เนื่องจากเดิมโคถูกเลี้ยงปนกัน บางตัวมาจากต่างฝูง (ต่างคอกกัน) ดังนั้นในช่วงแรกจึงต้องสังเกตพฤติกรรมของโคแต่ละตัวอย่างใกล้ชิด เช่น การแย่งกิน และการทำร้ายกัน หากพบโคที่มีอาการตกใจง่าย ไม่กล้ากินอาหาร ก็จะทำให้การเปลี่ยนทันที หลังจากนั้นฝึกให้โคกินอาหารแบบมีที่กินแยกแล้วจึงเริ่มแยกชนิดอาหารที่ให้กินตามแผนการทดลอง โดยมีการปรับให้กินอาหารใหม่ร่วมกับอาหารเดิมก่อน แล้วจึงค่อย ๆ เปลี่ยนมากินอาหารทดลองในที่สุด ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่กินได้ในแต่ละมื้อ ปริมาณน้ำนมที่รีดได้ของแต่ละตัวในแต่ละวัน เพื่อเป็นข้อมูลในการคำนวณปริมาณอาหารที่ให้กินแต่ละวัน ปริมาณอาหารชั้นที่ให้กินคำนวณตามปริมาณน้ำนม ในอัตรา 1 : 2 ปรับปริมาณอาหารชั้นทุก ๆ 5 วัน ตามปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้

การให้อาหารหยาบจะแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง คือที่เวลา 8.00 กับ 14.00 น. โดยรถผสมอาหารจะบรรทุก หญ้าที่หมักจากบ่อหมักมายังคอกทดลอง จากนั้นจะนำหญ้าที่แห้งใส่ลงไปในผสมกับหญ้าหมักในอัตราส่วน 10 % ของหญ้าหมัก ซึ่งรถบรรทุกอาหารดังกล่าวสามารถแสดงน้ำหนักของอาหารที่บรรทุกผ่านจอแสดงด้านข้าง

ส่วนอาหารชั้นที่ให้แก่โคทุกกลุ่มเป็นอาหารชนิดเดียวกันดังแสดงไว้ในตาราง 3.1 ปริมาณอาหารชั้นที่ผสมในแต่ละครั้งจะใช้ได้หมดภายใน 7 วัน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพเนื่องจากในสูตรมีรำละเอียดเป็นส่วนประกอบ ให้อาหารชั้น และกระถินหมัก 3 มื้อต่อวัน คือ ที่เวลา 8.00, 11.00 และ 15.00 น. ทำการชั่งอาหารชั้น เมล็ดข้าวโพดอบ โซเดียมไบคาร์บอเนต แยกเป็นรายตัวเตรียมไว้

ก่อน ส่วนกระถินหมักจะทำการชั่งเมื่อจะเลี้ยงเพื่อช่วยให้กลิ่นหอมยังคงอยู่ และเป็นการป้องกันการเสื่อมสภาพหลังเปิดถุงหมัก ทำการคลุกอาหารชั้นกับกระถินหมัก ในแต่ละมือทันทีก่อนนำไปเลี้ยง

2. ช่วงเก็บข้อมูล (collection period) หลังจากที่ได้กินอาหารชั้นแต่ละสูตรได้หมดตามปริมาณที่กำหนด ประมาณ 10 วัน จึงเริ่มทำการเก็บข้อมูลเป็นเวลา 21 วัน บันทึกปริมาณอาหารชั้นแต่ละสูตรที่กินได้ ปริมาณอาหารหยابที่ให้ในแต่ละมือ รวมทั้งปริมาณอาหารหยابที่เหลือโดยทำการกวาดรวมกันแล้วชั่งในตอนเช้าของทุก ๆ วัน พร้อมกับทำความสะอาดคอก สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารชั้น และวัตถุดิบแต่ละชนิดที่ใช้ประกอบสูตรอาหารชั้นทุก ๆ 7 วัน ส่วนหญ้ารัฐหมัก หญ้ารัฐแห้ง และกระถินหมัก สุ่มเก็บทุก ๆ 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาผสมรวมกันคลุกเคล้าให้เข้ากันจากนั้นจึงสุ่มเก็บมาเพื่อนำมาวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี บันทึกปริมาณน้ำมันของแต่ละวัน ในช่วงการทดลองจะสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำมัน 2 ครั้ง คือ ทุก ๆ 10 วัน และเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองทำการวัดรอบอกด้วยสายวัดแบบพิเศษที่สามารถอ่านค่าเป็นน้ำหนักตัวได้ เก็บตัวอย่างเลือด และวิเคราะห์องค์ประกอบของนม

□ การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance) โดยนำข้อมูลด้านจำนวนวันการให้นม ลำดับที่การให้นม อายุ และน้ำหนักโคแต่ละตัวมาใช้เป็นตัวแปรร่วมในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย เพื่อลดความแปรปรวนอันเนื่องมาจากตัวสัตว์ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี (Least Significant Difference, LSD)