

## Potensi Air Liur Sebagai Perantara dalam Pemeriksaan *Noninvasive* pada Hewan Piaraan

(*POTENTIAL OF SALIVA AS A MEDIATOR FOR THE NONINVASIVE EXAMINATION OF DOMESTIC ANIMALS*)

Sulaiman Ngongu Depamede<sup>1,2</sup>, Anwar Rosyidi<sup>1</sup>, Made Sriasih<sup>1</sup>,  
Dahlanuddin<sup>1</sup>, Enny Yulianti<sup>1</sup>, Suparman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi,  
Fakultas Peternakan, <sup>2</sup>Laboratorium Imunobiologi,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram  
Jl. Majapahit No. 62, Mataram, Nusa Tenggara Barat 83125  
Telp. +62370633603 E-mail: sulaiman\_n@unram.ac.id

### ABSTRAK

Air liur sebagai komponen biologis yang unik pada rongga mulut memiliki potensi sebagai mediator untuk uji biologis *noninvasive*. Untuk industri peternakan masa depan hal ini sangat dibutuhkan karena tuntutan *animal welfare*. Hingga saat ini penelitian dan pengembangan penggunaan air liur sebagai mediator uji *invasive* masih dominan untuk manusia, sementara untuk ternak/hewan piaraan masih terbatas. Teknik dan metode yang umum digunakan adalah yang berkaitan dengan analisis proteomik. Dengan metode ini banyak hal yang dapat diungkap tentang proteomik air liur yang bermanfaat bagi pengembangan biomarka berbasis air liur. Meskipun metode ini mahal, tetapi riset pemanfaatan air liur perlu segera dilakukan secara intensif di bidang peternakan. Diharapkan dapat segera dikembangkan metode uji biologi *noninvasive* berbasis air liur sebagai mediatornya.

Kata-kata kunci: air liur, *animal welfare*, *noninvasive*, hewan piaraan, proteomik

### ABSTRACT

Saliva as unique biological components of the oral cavity has potential as a mediator for noninvasive biological test. For future livestock industry the application of noninvasive test is strongly necessary due to animal welfare purpose. Until now the research and development of the using saliva as a mediator for invasive test is predominant for humans, while for livestock or domestic animals is still limited. Techniques and methods that are commonly used are related to proteomics analysis. With this method a lot of things that can be brought about proteomics of saliva are beneficial to the development of saliva-based biomarkers. Although this method is expensive, researches on the use of saliva in the field of livestock industries are urgently needed. It is expected that noninvasive biological test methods based on saliva as a mediator can be performed immediately.

Keywords: saliva, animal welfare, non-invasive, domestic animal, proteomic

### PENDAHULUAN

Masalah kesejahteraan hewan (*animal welfare*) semakin menjadi perhatian masyarakat dunia, bukan saja bagi para penyayang binatang tetapi juga bagi usaha atau industri peternakan (Good Practice Note, 2006). Termasuk di dalamnya adalah bagaimana memperlakukan seekor hewan saat akan diperiksa kondisi kesehatan atau status

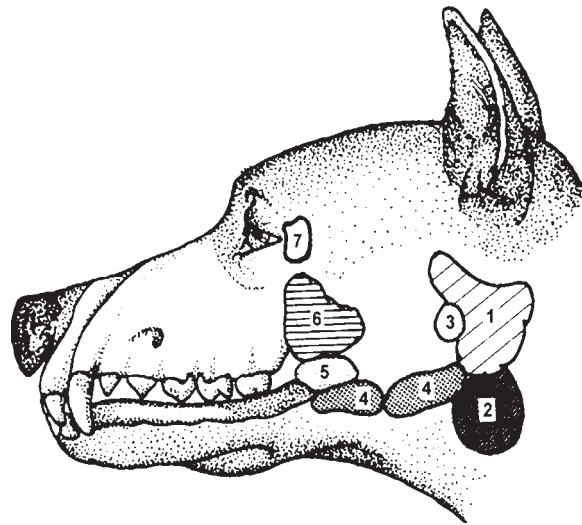
faalnya. Di Indonesia, meskipun masalah kesejahteraan hewan tersebut masih belum merupakan hal yang utama dalam tatalaksana peternakan, antisipasi terhadap isu-isu tersebut perlu dilakukan. Salah satu di antaranya adalah berkaitan dengan teknik pemeriksaan atau uji kesehatan ternak di lapangan yang dituntut agar praktis, akurat, dan sedapat mungkin mampu menekan tingkat stres ternak. Stres yang ditimbulkan saat melakukan pemeriksaan

kesehatan atau pemeriksaan status faali ternak dapat memengaruhi kenyamanan ternak yang kemudian dapat berpengaruh bagi produksinya. Untuk itu telah diupayakan beberapa metode yang memungkinkan stres tersebut dapat ditekan. Salah satu metode tersebut adalah melakukan pemeriksaan secara *non invasive* (Kumar *et al.*, 2012). Dalam tulisan ini dibahas tentang beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk mengkaji potensi air liur sebagai mediator atau sampel untuk uji klinis *non invasive*. Dibahas pula tentang beberapa teknik atau metode yang dikembangkan untuk melakukan pemeriksaan kesehatan dengan memanfaatkan air liur sebagai perantara *non-invasive*, khususnya pada manusia. Pertanyaannya adalah bagaimanakah pelaksanaan dan prospek penelitian dan pengembangan di bidang tersebut untuk industri peternakan?

### FISIOLOGI AIR LIUR

Air liur atau saliva merupakan cairan biologis yang kompleks dan unik, disekresikan ke dalam rongga mulut oleh kelenjar-kelenjar ludah (glandula parotis, submandibularis, dan sublingualis) seperti disajikan pada Gambar 1 (Bone, 1982), yang merupakan *cluster* dari sel-sel yang dikenal sebagai *acini* atau sel-sel *acinar* (Pederson *et al.*, 2002; Pfaffe *et al.*, 2011). Sel-sel *acinar* ini mensekresikan berbagai senyawa dan molekul yang membangun air liur seperti air, elektrolit, mucus, enzim, protein, dan peptida (Pfaffe *et al.*, 2011). Fungsi faali utama air liur dalam menjaga kesehatan tubuh hewan dimulai dari pemrosesan makanan di dalam rongga mulut dan pada sistem pencernaan bagian atas (Mandel 1987, Ruhl *et al.*, 2011). Oleh Lamy *et al.*, (2009) diuraikan lebih lanjut bahwa pada mamalia, fungsi utama air liur adalah sebagai pelumas/lubrikasi rongga mulut, melindungi jaringan rongga mulut, membantu proses mengunyah/mastikasi dan menelan/deglutasi serta berfungsi dalam menginisiasi proses reaksi enzimatis di rongga mulut.

Pada ternak ruminansia, air liur memiliki fungsi yang lebih kompleks daripada sekedar sebagai pelumas dalam membantu proses mengunyah dan menelan. Penjelasan klasik oleh McDougall (1948) mempertegas bahwa karena rumen tidak mensekresikan cairan seperti air liur maka air liur berfungsi sebagai media cair pengangkut pakan tercerna dari rumen kembali



**Gambar 1.** Kelenjar ludah yang berkaitan dengan fisiologi air liur (1-7) pada hewan. (1) Kelenjar parotis, (2) Kelenjar mandibularis, (3) Limfonodus Parotis, (4) Kelenjar sublingualis, (5) Kelenjar palatinus, (6) Kelenjar zigomatikus, dan (8) Kelenjar lakrimalis (Bone, 1982).

ke rongga mulut untuk dimamahbiak/ruminasi, kemudian dikembalikan lagi dan diteruskan ke usus halus via lambung. Lebih lanjut dikatakan pula bahwa air liur juga berfungsi sebagai bufer bagi tumbuh kembangnya mikroorganisme rumen (Aschenbach *et al.*, 2011).

Sebagai cairan yang berada pada pintu masuk pakan dan minuman ke dalam tubuh, fungsi air liur selain berkaitan dengan fisiologi rongga mulut dan fisiologi pencernaan, juga berkaitan dengan sistem imun tubuh terutama berkaitan dengan sistem kekebalan bawaan/*innate immunity system*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya beberapa komponen *innate* dan bahkan komponen imunitas daptan/*adaptive immunity* yang berpotensi sebagai sistem pertahanan kekebalan tubuh ternak. Komponen ini di antaranya adalah lisozim, laktoferin, mucin, amylase, cystatins, IgA dan IgG (Mungia *et al.*, 2008, Scarano *et al.*, 2010, Depamede *et al.*, 2012). Lebih lanjut Lamy dan Mau (2012) mengemukakan bahwa air liur memainkan berbagai peranan sangat penting dan menyeluruh sebagai pengawal gerbang utama jalan masuknya pakan-minuman dan berbagai mikroba patogen dan organisme oportunistis.

## POTENSI AIR LIUR SEBAGAI MEDIA DIAGNOSIS NONINVASIVE DAN METODE YANG UMUM DIGUNAKAN

Pemanfaatan air liur untuk tujuan diagnosis sudah dilakukan pada air liur manusia (Al Kawas *et al.*, 2012), antara lain untuk mendeteksi apakah seseorang mengidap virus *human immunodeficiency virus* (HIV), gangguan jantung, penyakit autoimun, serta beberapa jenis kanker (Lee dan Wong, 2009; Wu *et al.*, 2009). Hasilnya menunjukkan bahwa pengujian menggunakan air liur sebagai media secara umum tidak berbeda dari serum atau plasma, bahkan untuk mendeteksi *squamous cell carcinoma* pada mulut, air liur lebih sensitif dan lebih spesifik dibandingkan dengan pemeriksaan menggunakan sampel darah (Hu *et al.*, 2008). Hal ini merupakan keuntungan tersendiri karena pengambilan sampel air liur jauh lebih mudah dibandingkan pengambilan darah dari tubuh pasien sehingga sangat mengurangi beban stres bagi si pasien.

Sebagaimana diungkapkan di atas, pemanfaatan air liur sebagai perantara diagnosis suatu penyakit banyak dilakukan pada manusia. Dengan semakin meningkatnya perhatian orang pada kesejahteraan hewan/*animal welfare* serta keperluan menjaga konsistensi produksi ternak dengan mengurangi sebisa mungkin efek stres akibat tindakan uji klinis atau pemeriksaan rutin pada ternak, maka pemanfaatan air liur telah pula dilakukan pada ternak atau hewan piaraan.

Beberapa jenis uji dan metode yang digunakan dalam melakukan pemeriksaan kesehatan ternak menggunakan media air liur pada prinsipnya serupa dengan yang dilakukan menggunakan sampel darah atau serum/plasma, meskipun beberapa masih dalam proses riset dan pengembangan sebagaimana dibahas oleh Lamy dan Mau (2012). Hal yang paling menonjol adalah pengamatan terhadap *proteomic* air liur dikaitkan dengan penilaian terhadap asupan pakan dan status nutrisi ternak dan penilaian terhadap status faali seekor ternak.

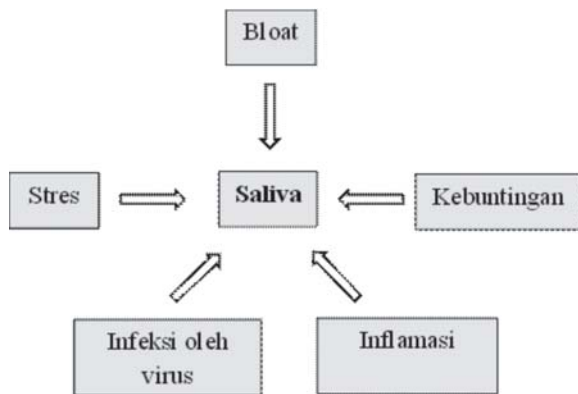
Penilaian terhadap asupan pakan dan status nutrisi dan pakan ternak sebenarnya sudah diupayakan beberapa puluh tahun silam sebagaimana yang diawali melalui riset yang dilakukan McDougall (1948) dengan mengamati komposisi dan *output* air liur domba. Riset-riset selanjutnya mengungkapkan bahwa komposisi protein atau enzim pada air liur hewan/ternak

berkaitan erat dengan spesies ternak dan jenis pakan yang dikonsumsi mereka (Lamy dan Mau, 2012). Sebagai contoh, diungkapkan bahwa enzim amilase ditemukan dominan pada air liur manusia dan primata sementara enzim tersebut hanya sedikit bahkan tidak dijumpai pada kelompok ruminansia (Lamy *et al.*, 2009, Lamy dan Mau, 2012).

Lamy dan Mau (2012) juga membahas hal yang menarik dari keterkaitan antara air liur ternak ruminansia dan status atau keberadaan beberapa spesies pakan ternak. Diungkapkan bahwa air liur ruminansia berpengaruh pada upaya tanaman untuk beradaptasi terhadap kegiatan merumput (*grazing*) ternak atau hewan herbivora. Hal ini diperkuat berdasarkan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa ada indikasi bibit tanaman yang dipapar dengan air liur ruminansia, ekspresi protein-protein yang berhubungan dengan sistem pertahanan basal dan oksidatif stres dari tanaman tersebut cenderung meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan bibit tanaman yang tidak terpapar air liur ruminansia (Fan *et al.*, 2011; Lamy dan Mau, 2012).

Penilaian status faali seekor ternak dilakukan untuk pengecekan apakah seekor hewan dalam keadaan sehat atau sakit. Kondisi ini dapat berkaitan dengan apakah ternak tersebut terserang atau tertular kuman menular atau dapat pula sebagai akibat dari perubahan hormonal karena stres atau adanya siklus reproduksi dan kebuntingan. Dalam kaitan ini penggunaan air liur sebagai mediator untuk penilaian tersebut memiliki peran yang penting dibandingkan dengan cairan tubuh yang lain seperti urin dan darah.

Keuntungan menggunakan sampel air liur, sebagaimana diungkapkan di depan, karena secara umum air liur dapat diperoleh tanpa terlalu menyakiti ternak (*noninvasive*) sehingga stres dapat ditekan. Air liur tidak mengalami proses penjendalan sebagaimana pada darah sehingga penanganannya relatif lebih mudah dan risiko adanya lisis seperti darah dapat dihindari. Pemanfaatan air liur sebagai sampel uji kadar urea dengan hasil sebanding dengan kadar urea darah pada domba dilaporkan oleh Piccione *et al.*, (2006), dan pada sapi bali (*Bos sondaicus*) dilaporkan oleh Depamede dan Dahlanuddin (2013). Lebih lanjut Lamy dan Mau (2012) merangkum peran penting air liur tersebut dalam sebuah diagram sebagaimana disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Peran penting air liur pada berbagai proses yang berlangsung didalam rongga mulut (Lamy dan Mau, 2012).

Dari Gambar 2 tersaji bahwa air liur berkaitan erat dengan beberapa proses dan sistem yang terdapat pada tubuh seekor ternak. Hal ini yang memungkinkan air liur dapat digunakan untuk mengetahui status faali seekor ternak. Status faali tersebut dapat meliputi aspek-aspek reproduksi dan kebuntingan, kesehatan dan sistem imun akibat infeksi (penilaian inflamasi dan infeksi virus), atau penilaian kondisi akibat malnutrisi, dan bahkan penilaian terhadap kondisi stres dari ternak tersebut.

## PROSPEK DAN TANTANGAN LITBANG

Dari uraian di atas tampak bahwa pemanfaatan air liur sebagai mediator penilaian kondisi faali seekor ternak sangat menjanjikan. Akan tetapi secara teknis masih banyak hal yang perlu diteliti secara seksama. Hal ini mulai dari teknik penampungan dan penanganan air liur hingga pada pemilihan metode yang tepat untuk melakukan pemeriksaan. Masalah yang tidak kalah penting pula untuk diperhatikan adalah adanya variasi per individu yang cukup signifikan saat penilaian dilakukan pada air liur ternak (Castagnola *et al.*, 2012).

Dari segi teknik penampungan, apabila sumbernya adalah air liur utuh dari rongga mulut maka proses penampungannya tidak terlalu masalah. Penampungan dapat dilakukan secara langsung dari rongga mulut menggunakan pipet khusus atau spons khusus (Lamy *et al.*, 2009; Yisehak *et al.*, 2011). Tindakan selanjutnya adalah melakukan

sentrifugasi untuk memisahkan komponen yang tidak dikehendaki, seperti yang berasal dari sisa-sisa pakan. Tetapi, untuk penampungan dari kelenjar air liur, misalnya dari kelenjar parotis atau mandibularis, maka diperlukan teknik dan alat khusus antara lain menggunakan kateter (Lamy *et al.*, 2009). Dalam kondisi seperti ini ternak akan mengalami kesakitan dan stres sehingga diperlukan anastesi lokal. Selain itu, dapat terjadi sampel air liur tercemar oleh darah dari rongga mulut.

Setelah masalah penampungan, teknik atau metode analisis yang akan digunakan merupakan masalah berikutnya. Saat ini yang paling umum digunakan adalah metode atau teknik yang berkaitan dengan analisis *proteomic* air liur antara lain *high performance liquid chromatography* (HPLC), *electrospray ionization* (ESI), atau kombinasinya seperti HPLC-ESI-MS, *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) atau MALDI-TOF, serta *Fourier transform infrared* (FT-IR) *spectroscopy* (Cabras *et al.*, 2012; Silletti *et al.*, 2010; Lamy *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006). Analisis proteomik air liur sapi bali (*Bos sondaicus*) menggunakan teknik MALDI-TOF dilaporkan oleh Depamede (2013). Semua teknik dan peralatan tersebut mahal dan butuh teknisi dengan keterampilan khusus dan harus dilakukan di laboratorium. Ke depan perlu dikembangkan alat-alat sederhana dan tepat guna yang dapat digunakan *on the spot* atau *on farm* seperti uji cepat imunokromatografi (IC) sebagaimana diuraikan oleh Posthuma-Trimpue *et al.*, (2009). Sejauh ini metode IC *noninvasive* yang telah tersedia di pasaran untuk ternak adalah untuk uji kebuntingan pada kuda yang menggunakan urin sebagai mediana. Ke depan uji menggunakan air liur perlu juga diteliti dan dikembangkan.

## SIMPULAN

Air liur sebagai media biologis yang unik di dalam rongga mulut memiliki potensi tinggi sebagai mediator uji biologis atau faali *noninvasive*. Hal ini telah diteliti dan dilakukan pada manusia. Penelitian dan pengembangan pemanfaatan air liur sebagai mediator uji *noninvasive* pada ternak atau hewan piaraan perlu segera dilakukan terutama dalam mengantisipasi tuntutan kesejahteraan hewan/*animal welfare* bagi industri peternakan masa depan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Naskah ulas balik (*review*) ini merupakan bagian dari penelitian Hibah Kompetensi (Hikom) yang dilakukan penulis (SND) dengan bantuan dana dari Dirjen Dikti, Mendikbud No.126/SP2H/PL/Dit.Litabmas/III/2012 dan No.12/SP2H/PL/Dit.Litabmas/V/2013.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al Kawas S, Rahim ZHA, Ferguson DB. 2012. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Archives of Oral Biology*. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.06.013.
- Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gäbel G. 2011. Ruminant Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J Anim Sci* 89: 1092-1107.
- Bone JF. 1982. *Animal Anatomy and Physiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Virginia, Reston Publishing Company. P. 139.
- Cabras T, Boi R, Pisano E, Iavarone F, Fanali C, Nemolato S, Faa G, Castagnola M, Messina I. 2012. HPLC-ESEI-MS and MS/MS structural characterization of multifucoylated N-glycoforms of the basic prolin-rich protein IB-8a CON1+ in human saliva. *J Sep Sci* 35(9): 1079-86. doi: 10.1002/jssc.201101066.
- Castagnola M, Cabras T, Iavarone F, Fanali C, Nemolato S, Peluso G, Laura S, Bosello SL, Faa G, Ferraccioli G, Messina I. 2012. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert Rev Proteomics* 9: 33-46.
- Chauncey HH, Henriques BL, Tanzer JM. 1963. Comparative enzyme activity of saliva from the sheep, hog, dog, rabbit, rat and human. *Arch Oral Biol* 8: 615-627.
- Depamede SN, Dahlanuddin. 2013. Saliva Urea Nitrogen (SalUN) of Bali cattle (*Bos javanicus*) fed grass or complete diet: A preliminary study on the utilization of saliva as a non-invasive specimen. *Open Science Repository Agriculture, Online (open-access)*. Doi:10.7392/openaccess.700819977.
- Depamede SN, Asri N, Julisaniah NI, Suryadi BF, Kisworo D. 2012. Isolation and partial purification of lysozyme from saliva of Bali cattle (*Bos sondaicus*) using an aqueous mixture of polyethylene glycol (PEG) with sodium sulfate. *African Journal of Biotechnology* 11(8): 1977-1980.
- Depamede SN. 2013. Proteomic analysis of a 14.2 kDa protein isolated from Bali cattle (*Bos sondaicus/javanicus*) saliva using 1-D SDS-PAGE gel and MALDITOF-TOF mass spectrometer. *Italian Journal of Animal Science* 12(e59):371-374.
- Fan W, Cui W, Li X, Chen S, Liu G, Shen S. 2011. Proteomics analysis of rice seedling responses to ovine saliva. *J Plant Physiol* 168: 500-509.
- Good Practice Note. 2006. *Animal Welfare in Livestock Operations*. IFC No.6.
- Hu S, Arellano M, Boonthueung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, Elashoff D, Wei R, Loo JA, Wong DT. 2008. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* 14: 6246-52.
- Hu S, Li Y, Wang J, Xie Y, Tjon K, Wolinsky L, Loo RRO, Loo J.A, Wong DT. 2006. Human Saliva Proteome and Transcriptome. *J Dent Res* 85: 1129-1133.
- Jacobsen N. 1970. Salivary amylase. II. Alpha-amylase in salivary glands of the Macaca irus monkey, the Cercopithecus aethiops monkey, and man. *Caries Res* 4:200-205.
- Kumar B, Manuja A, Aich P. 2012. Stress and its impact on farm animals. *Frontiers in Bioscience E4*: 1759-1767.
- Lamy E, da Costa E, Santos R, Silva FC, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Baptista ES. 2009. Sheep and goat saliva proteome analysis: A useful tool for ingestive behavior research? *Physiology & Behavior* 98: 393-401.
- Lamy E, Mau M. 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *J Prot* doi:10.1016/j.jprot.2012.05.007.
- Lee Y-H, Wong DT. 2009. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent* 22: 241-248.
- Mandel I. D. 1987. The functions of saliva. *J Dent Res* 66: 623-627.

- Mc Dougall EI. 1948. Studies on Ruminant Saliva 1. The composition and Output of Sheep's Saliva. *Biochemical J* 43 (1): 99-108.
- Mungia R, Cano SM, Johnson DA, Dang H, Brown JP. 2008. Interaction of age and specific saliva component output on caries. *Aging Clin Exp Res* 20: 503-508.
- Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntoffe B. 2002. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 8: 117-29.
- Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. 2011. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clinical Chemistry* 57 (5): 1-13.
- Piccione G, Foà A, Bertolucci C, Caola G. 2006. Daily rhythm of salivary and serum urea concentration in sheep. *J of Circadian Rhythms* 4: 16.
- Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. 2009. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393: 569-582.
- Ruhl S, Berlenbach P, Langenfelder S, Horl D, Lehn N, Hiller K-A, Schmalz G, Durchschlag H. 2011. Integrity of Proteins in Human Saliva after Sterilization by Gamma Irradiation. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (3): 749-755.
- Scarano E, Fiorita V, Picciotti PM, Passali GC, Calò L, Cabras T, Inzitari R, Fanali C, Messina I, Castagnola M, Paludetti G. 2010. Proteomics of saliva: personal experience. *Acta Otorhinolaryngologia Italia* 30(3): 125-130.
- Silletti E, Vitorino RMP, Schipper R, Amado FML, Vingerhoeds MH. 2010. Identification of salivary proteins at oil-water interfaces stabilized by lysozyme and  $\alpha$ -lactoglobulin. *Archive of Oral Biology* 55: 268-278.
- Wheeler TT, Hood KA, Maqbool NJ, McEwan JC, Bingle CD, Zhao S. 2007. Expansion of the Bactericidal/Permeability Increasing-like (BPI-like) protein locus in cattle. *BMC Genomics* 8: 75. doi:10.1186/1471-2164-8-75.
- Wu ZZ, Wang JG, Zhang XL. 2009. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 15: 865-870. doi: 10.3748/wjg.15.865.
- Yisehak K, Becker A, Belay D, Bosch G, Hendriks WH, Clauss M, Janssens GPJ. 2011. Salivary amino acid concentrations in zebu (*Bos indicus*) and zebu hybrids (*Bos indicus*×*Bos taurus*) fed a tannin-rich diet. *Belg J Zool* 141(2): 93-96.