

Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology

journal homepage: www.jtbb.or.id

Identifikasi sifat dan distribusi sel endokrin ghrelin di lambung tikus (*Rattus norvegicus*): studi immunohistokimia pada kondisi obesitas

Teguh Budipitojo¹, Hevi Wihadmadyatami¹, and Ganies Riza Aristya²¹ Laboratorium Mikroanatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada² Laboratorium Genetika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah MadaEmail: budipitojo@ugm.ac.id

ARTICLE INFO

Article history

Received 18 September 2015

Received in revised form 16
October 2015

Accepted 29 October 2015

Keywords

Ghrelin

Stomach

Obesity

Immunohistochemistry

ABSTRACT

Obesity is one of major nutritional problems in the world. Obesity is very dangerous, especially when concentrated in the abdomen, because it is closely linked to various diseases such as diabetes, hypertension, heart disease, which can to causing death. This study aims to identify the nature and distribution of ghrelin on gastric endocrine cells in the obese rat (*Rattus norvegicus*) by using immunohistochemical techniques. The results will strengthen the understanding of the role and function of ghrelin as an alternative therapeutic target on obesity. The research used gastric tissues of ten obese and control rats which were stained with avidin-biotin-peroxidase complex method of immunohistochemistry. The results showed the existence of two types of ghrelin-producing cells (open and closed types) on the gastric mucosa of control rats, and only one type of ghrelin producing cells (open type) in obese rats. The intensity of ghrelin immunoreactive positive cells was detected weak in obese rats, but very strong in control rats. Ghrelin endocrine cells mainly distributed in the basal part of the gastric mucosa of the fundus parts, with a very small number in obese rats, but highly abundant in control rats. This study confirmed the decrease of the ghrelin synthesis and secretion in obese rat (*Rattus norvegicus*) at the cellular level. The decrease of ghrelin synthesis is characterized by a reduction on the number of ghrelin producing cells, the disappearance of the close type of ghrelin producing cells, and the low activity of protein synthesis in the ghrelin producing cells. Ghrelin endocrine cells distributed mainly in the basal part of the gastric mucosa, especially in the fundus parts.

1. Pendahuluan

Ghrelin adalah hormon peptida yang mengatur asupan makanan dan merangsang pelepasan hormon pertumbuhan. Peptida ini ditemukan pada tahun 1999 oleh Kojima (Kojima *et al.*, 1999). Pemurnian ghrelin dilakukan dengan skrining beberapa jaringan, dan hormon dalam jumlah tinggi ditemukan dalam ekstrak lambung (Dimaraki dan Jaffe, 2006). Penemuan ghrelin berawal dari pencarian ligan endogen untuk reseptor pelepasan hormon pertumbuhan (*Growth Hormone Secretagogue Receptor* (GHS-R) (Murray *et al.*, 2003). Kata ghrelin awalnya berasal dari kata *ghre* yang dalam bahasa Proto-Indo-Eropa berarti "tumbuh" (Kojima *et al.*, 1999).

Organ utama yang memproduksi ghrelin adalah lambung, dan selanjutnya penelitian imunohistokimia telah menunjukkan bahwa peptida ini diproduksi dalam sel endokrin khusus yang dikenal sebagai sel X/A yang tersebar dalam lapisan mukosa lambung (Date *et al.*, 2000; Solcia *et al.*, 1975). Sel-sel ini mengandung butiran padat berbentuk bulat. Sumber pembentukan ghrelin yang paling melimpah adalah lambung bagian fundus yang menghasilkan sepuluh kali lebih banyak hormon dibanding duodenum (Date *et al.*, 2000; Gnanapavan *et al.*, 2002; Ariyasu *et al.*, 2001). Sel-sel yang mensekresikan ghrelin juga dapat ditemukan dalam usus kecil dan besar (Date *et al.*, 2000). Sebagian besar dari sel X/A merupakan sel "tertutup", yang berarti bahwa sel ini tidak

dapat langsung berhubungan dengan lumen lambung (Sakata *et al.*, 2002). Sejumlah kecil ghrelin diproduksi di paru-paru, pulau pankreas, gonad, korteks adrenal, plasenta dan otak (Lely *et al.*, 2004). Di sistem syaraf pusat, sel neuron ghrelin dapat diidentifikasi di dalam inti arkuata hipotalamus yang merupakan daerah pengendalian nafsu makan (Kojima *et al.*, 1999). Konsentrasi ghrelin dalam sampel darah manusia adalah 100-120 fmol/ml (Hosoda *et al.*, 2005). Regulator utama level ghrelin dalam plasma adalah asupan makanan (Ueno *et al.*, 2005; Kojima dan Kagawa, 2002). Tingkat konsentrasi ghrelin plasma meningkat selama kelaparan dan menurun setelah makan (Ueno *et al.*, 2005). Pemberian glukosa secara oral atau intravena menurunkan konsentrasi ghrelin dalam plasma (Tschop *et al.*, 2000). Penderita anoreksia nervosa sangat meningkatkan kadar ghrelin dalam plasmanya (Kojima *et al.*, 2004).

Ghrelin adalah faktor yang sangat penting dalam homeostasis energi, sebuah molekul yang bersifat oreksigenik (meningkatkan nafsu makan) dan adipogenik (meningkatkan pembentukan lemak) kuat (Ueno *et al.*, 2005). Pemberian hormon ini akan merangsang nafsu makan, asupan makanan dan meningkatkan berat badan (Cummings, 2006). Tingkat sirkulasi ghrelin menurun setelah makan dan meningkat sebelum makan (Cummings, 2006). Protein ini menstimulasi nafsu makan melalui nukleus arkuata hipotalamus (Kojima *et al.*, 2004). Nukleus arkuata juga merupakan situs target leptin, hormon penekan nafsu makan dari jaringan lemak (Cummings, 2006).

Ghrelin yang beredar dalam sirkulasi dapat mengaktifkan neuron yang mengekspresikan neuropeptid Y (NPY) dan agouti – related peptide (AGRP) dalam nukleus arkuata (Ueno *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2004). NPY dan AGRP merangsang asupan makanan (Kojima *et al.*, 2004). Pemberian ghrelin secara terus menerus dapat meningkatkan berat badan (Cummings, 2006).

Obesitas merupakan salah satu masalah utama kesehatan masyarakat, yang terjadi pada saat indeks massa tubuh (BMI) mencapai lebih besar dari 30. Prevalensi obesitas di Amerika Serikat diperkirakan 31% (Hedley *et al.*, 2002). Lebih dari 15% populasi di negara-negara Eropa seperti Inggris, Jerman dan Polandia mengalami obesitas (Östman *et al.*, 2004). Di Indonesia kejadian obesitas menunjukkan kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun. Obesitas sangat terkait dengan komorbiditas seperti diabetes, hipertensi, penyakit arteri koroner dan sulit tidur.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan

identifikasi sifat-sifat sel penghasil ghrelin dan distribusinya di mukosa lambung sebagai produsen utama ghrelin dalam tubuh pada keadaan obesitas, dengan teknik immunohistokimia. Hasil penelitian akan memberikan landasan bagi upaya pemanfaatan sel-sel penghasil ghrelin sebagai alternatif terapeutik target kejadian obesitas, sehingga kedepannya diharapkan dapat dikembangkan obat anti obesitas yang berbasis pada reseptor ghrelin.

2. Bahan dan cara kerja

Sampel tikus (*Rattus norvegicus*) sebanyak 20 ekor dibagi ke dalam 2 kelompok, perlakuan obesitas sebanyak 10 ekor dan kontrol sebanyak 10 ekor. Kelompok perlakuan diberi ransum pakan obesitas secara *ad libitum*, sedangkan kelompok kontrol memperoleh asupan pakan normal selama 2 bulan. Penimbangan berat badan dilakukan setiap hari pada tikus perlakuan dan kontrol, untuk memperoleh data peningkatan berat badan harian. Pencapaian obesitas ditentukan berdasarkan perhitungan indeks obesitas oleh Rohrer. Tikus dikategorikan obesitas jika mencapai lebih dari angka 30 dari nilai indeks Rohrer. Hasil perlakuan menunjukkan bahwa tikus perlakuan telah melampaui angka indeks obesitas Rohrer pada hari ke 60, sehingga dikategorikan sebagai tikus obesitas. Pada hari ke 60, tikus perlakuan dan kontrol dikorbankan, setelah terlebih dahulu ditidurkan dengan pemberian ketamin. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel jaringan lambung, difiksasi dalam larutan Bouin's selama 24 jam, untuk selanjutnya diproses sebagai parafin blok dan dipotong dengan ketebalan 4 μm .

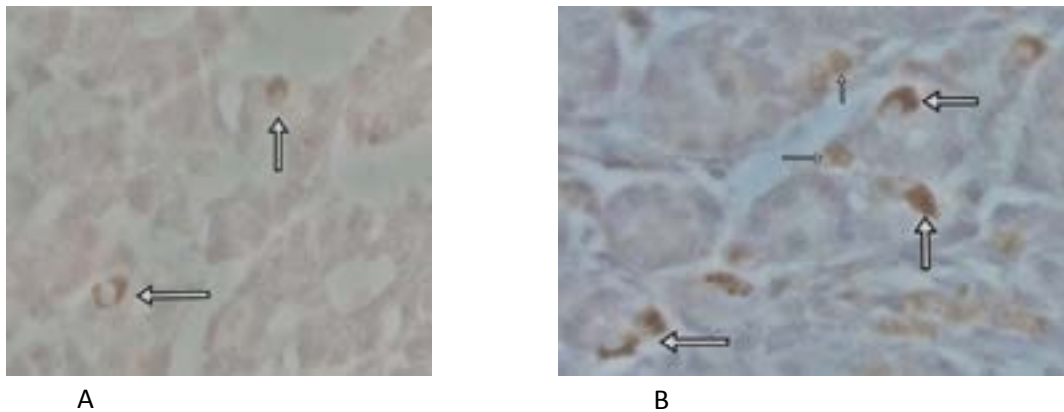
Deteksi sel ghrelin secara immunohistokimia dilakukan menggunakan anti-porcine ghrelin yang dibuat dalam rabbit (# 1015) dengan metode ABC. Pewarnaan immunohistokimia dilakukan dengan prosedur *avidin-biotin-peroxidase complex* (ABC). Secara singkat, tahapan pewarnaan digambarkan sebagai rangkaian proses berikut: setelah deparafinisasi dan rehidrasi, sampel diinkubasi dalam aquades selama 10 menit dengan *microwave* sebagai perlakuan antigen retrieval, kemudian diinkubasi dalam 100 ml methanol yang mengandung 30% H_2O_2 selama 10 menit untuk menghambat aktivitas endogen peroksidase. Setelah dicuci dengan PBS, kemudian secara berurutan diinkubasi dalam serum kambing normal selama 30 menit pada suhu kamar dan selanjutnya dengan serum anti-porcine ghrelin selama 10 jam pada suhu 4° C pada pengenceran 1:1000. Setelah dicuci dengan PBS, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar dengan serum anti-IgG kelinci yang

dibiotinilasi dalam pengenceran 1:200 (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, CA). Setelah dicuci lebih lanjut dengan PBS, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dengan kompleks avidin-biotin-peroksidase (Vectastain ABC kit) yang disiapkan sesuai dengan instruksi pabrik. Setelah dicuci dengan PBS selama 15 min, sampel direaksikan dengan 0,02 % 3,3-diaminobenzidinetetrachloride (DAB) yang dicampur dengan 0,06% hidrogen peroksida (H_2O_2) selama 10-15 menit untuk mendeteksi immunoreaktivitasnya. Setelah dicuci dengan aquades, didehidrasi dengan etanol bertingkat, dijernihkan dengan xilol, dipasang dengan balsem kanada (Merck, Darmstadt, Jerman) pada gelas obyek, kemudiann dilihat di bawah mikroskop cahaya (BX60 , OLYMPUS , Tokyo , Jepang) dan diambil

fotomikroskopiknya.

3. Hasil dan pembahasan

Pengamatan terhadap hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel yang immunoreaktif positif terhadap ghrelin (sel endokrin ghrelin) pada mukosa lambung tikus perlakuan dan kontrol terutama terdistribusi di sel-sel tunggal. Sel-sel endokrin ghrelin tersebut dapat dikategorikan dalam dua tipe sel, yaitu tipe sel terbuka dan tipe sel tertutup (Gambar 1). Gambaran mikroskopis menunjukkan bahwa pada tikus kontrol terdeteksi keberadaan sel endokrin ghrelin tipe terbuka dan tertutup dalam mukosa lambung, terutama di bagian fundus (Gambar 1B), sedangkan pada tikus perlakuan hanya terdeteksi keberadaan sel tipe terbuka (Gambar 1A).

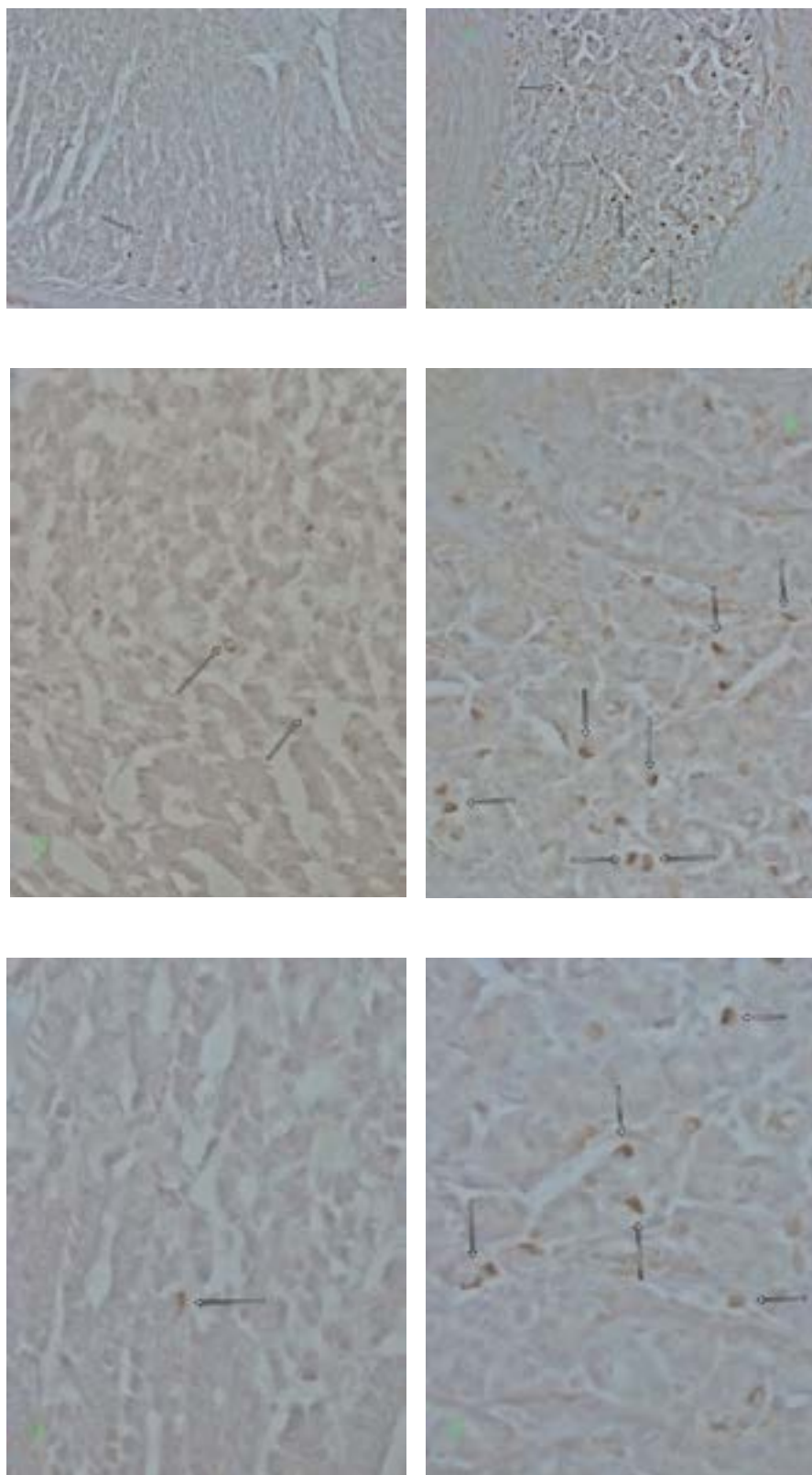


Gambar 1. Bagian fundus lambung tikus perlakuan dan kontrol memperlihatkan sel-sel yang immunoreaktif terhadap ghrelin. A. Pada tikus perlakuan hanya terdapat sel endokrin ghrelin tipe terbuka (panah) saja. B. Pada tikus kontrol terdapat sel endokrin ghrelin tipe terbuka yang merupakan bagian dari epithelium dinding kelenjar lambung (panah besar) dan tipe tertutup yang terletak diantara kelenjar lambung (panah kecil).

Sel-sel endokrin ghrelin pada umumnya berbentuk bulat atau oval, namun kadang-kadang berbentuk tidak teratur dengan prosesus pendek (Gambar 1). Inti sel ini biasanya besar, berupa struktur bulat yang menempati bagian tengah sel (Gambar 1). Sementara sel endokrin ghrelin pada tikus yang mengalami obesitas, menunjukkan reaksi immunoreaktivitas terhadap ghrelin dengan intensitas lemah (Gambar 1A), reaksi immunoreaktivitas pada tikus kontrol (tidak-obesitas) terdeteksi sangat kuat (Gambar 1B).

Distribusi sel endokrin ghrelin dalam lambung tikus perlakuan dan kontrol terutama terdapat pada

daerah fundus (Gambar 2). Jumlah sel endokrin ghrelin yang terdistribusi dalam mukosa lambung bagian fundus sangat sedikit pada tikus kelompok perlakuan obesitas (Gambar 2A, 2C, 2E), namun sangat melimpah pada tikus kelompok kontrol (Gambar 2B, 2D, 2F). Lokasi sel endokrin ghrelin dalam lambung bagian fundus tersebut, terkonsentrasi di zona paling bawah (dalam) dari mukosa lambung berbatasan dengan tunika sub-mukosa, sementara di zona leher kelenjar hanya dapat ditemukan secara sporadis, pada kelompok kontrol (Gambar 2B, 2D, 2F) namun tidak pada kelompok perlakuan (Gambar 2A, 2C, 2E).



Gambar 2. Bagian fundus lambung tikus perlakuan dan kontrol memperlihatkan sel-sel yang immunoreaktif terhadap ghrelin dengan jumlah positif sel dan intensitas pewarnaan bervariasi. Pada perbesaran lemah, tanda panah memperlihatkan sedikit sel endokrin ghrelin dengan intensitas pewarnaan rendah pada tikus perlakuan (A), namun banyak sel endokrin ghrelin dengan intensitas pewarnaan kuat pada tikus kontrol (B). Pola yang sama terlihat pada tikus perlakuan dan kontrol pada perbesaran sedang (C dan D) dan perbesaran kuat (E dan F).

Telah diketahui bahwa sel-sel endokrin gastrointestinal terdiri dari dua jenis sel, yaitu; tipe sel terbuka yang dapat berhubungan dengan lumen kelenjar, dan tipe sel tertutup, yang tidak dapat berhubungan langsung dengan lumen kelenjar (Solcia et al., 2000). Sel-sel tipe terbuka, secara fungsional diatur oleh informasi yang diterima dari lumen, seperti informasi tentang nutrisi dan pH. Sedangkan tipe sel tertutup secara fungsional dipengaruhi oleh hormon, stimulus saraf atau distensi mekanis (Lewin, 1986; Solcia et al., 2000). Penelitian ini menunjukkan keberadaan 2 tipe sel penghasil ghrelin pada sel mukosa lambung tikus kelompok kontrol, yaitu sel tipe terbuka dan sel tipe tertutup, dan hanya 1 tipe sel penghasil ghrelin pada kelompok perlakuan obesitas, yaitu sel tipe terbuka.

Pengaturan sintesis dan sekresi ghrelin pada kondisi fisiologis dan patologis masih belum diketahui dan tetap menjadi kontroversi. Konsentrasi ghrelin dalam sirkulasi berbanding terbalik dengan indeks massa tubuh, sehingga sekresi ghrelin akan meningkat pada anoreksia (kehilangan nafsu makan) dan kakeksia (penurunan berat badan akibat penyakit kronis), namun berkurang pada obesitas dan normal kembali pada saat berat badan ideal dicapai (Leite-Moreira and Soares, 2007). Tingkat konsentrasi ghrelin juga akan menurun pada penderita obesitas yang berpuasa, yang mungkin merupakan respon kompensasi untuk menjaga keseimbangan energi (Cummings et al., 2006). Di antara penderita obesitas, konsentrasi plasma ghrelin pada penderita dewasa sehat yang resisten terhadap insulin lebih rendah dibanding yang lebih sensitif pada insulin (McLaughlin et al., 2004). Satu-satunya pengecualian tentang hubungan negatif antara indeks massa tubuh dan sekresi ghrelin adalah sindrom Prader-Willi dimana obesitas terkait dengan hipersekresi ghrelin (Leite-Moreira and Soares, 2007). Meskipun demikian, mekanisme penurunan sekresi ghrelin pada penderita obesitas masih belum diketahui (Leite-Moreira and Soares, 2007). Hasil penelitian ini memperlihatkan kecenderungan yang sama dengan penelitian terdahulu sebagaimana tersebut di atas pada tingkat seluler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel yang memproduksi ghrelin di dalam lambung bagian fundus pada tikus perlakuan yang obesitas jumlahnya sangat sedikit bila dibanding dengan tikus kontrol. Demikian juga gambaran level immunoreaktivitas dari sel-sel yang positif terhadap ghrelin memperlihatkan intensitas yang lebih lemah pada tikus perlakuan yang obesitas dibanding dengan tikus kontrol yang non-obesitas. Kedua fakta tersebut mengindikasikan bahwa penurunan sekresi ghrelin

pada obesitas didahului dengan penurunan jumlah sel yang memproduksi ghrelin dan berkurangnya aktivitas produksi ghrelin dalam masing-masing sel tersebut.

Dalam penelitian ini, berkurangnya aktivitas produksi ghrelin terutama ditunjukkan oleh berkurangnya sel-sel yang immunoreaktif positif terhadap ghrelin pada mukosa lambung tikus perlakuan yang obesitas dibanding kontrol dan berikutnya oleh gambaran intensitas immunoreaktivitas yang lemah dari sel-sel mukosa lambung yang positif ghrelin. Disamping itu, pada pengamatan mikroskopik dengan perbesaran kuat, diketahui bahwa terdapat 2 tipe sel yang memproduksi ghrelin pada tikus kontrol yaitu tipe terbuka dan tipe tertutup, sedangkan pada tikus perlakuan obesitas hanya terdapat satu tipe sel terbuka saja. Berkurangnya aktivitas produksi ghrelin mungkin karena meningkatnya sekresi insulin sebagai akibat dari proses keseimbangan energi positif pada keadaan obesitas. Korelasi antara indeks massa tubuh dengan risiko diabetes melitus tipe 2 adalah positif, dan hubungan antara obesitas dengan resistensi insulin terutama disebabkan oleh perubahan fungsi jaringan adiposa, khususnya dengan meningkatkan pelepasan asam lemak bebas (Westphal et al., 2008). Hiperinsulinemia dilaporkan dapat menurunkan konsentrasi ghrelin dalam plasma (Saad et al., 2002). Sekresi ghrelin berkurang oleh pemberian glukosa baik secara intravena ataupun peroral, begitu juga pada hipoglikemia yang diinduksi insulin (Saad et al., 2002). Pengaruh penghambatan akibat pemberian insulin secara berlebihan terhadap sekresi ghrelin sejalan dengan hubungan negatif yang kuat antara ghrelin dan level insulin yang telah diprediksi oleh korelasi negatif antara tingkat konsentrasi ghrelin dengan indeks massa tubuh. Meskipun demikian masih belum jelas apakah insulin dan glukosa, secara sendiri sendiri, menghambat secara langsung sekresi ghrelin (Saad et al., 2002).

4. Kesimpulan

Penelitian ini mengkonfirmasi penurunan sintesis dan sekresi ghrelin pada keadaan obesitas tikus putih (*Rattus norvegicus*) di tingkat seluler. Penurunan tersebut ditandai dengan berkurangnya jumlah sel penghasil ghrelin, hilangnya sel penghasil ghrelin tipe tertutup, dan rendahnya aktivitas sintesis protein dalam sel penghasil ghrelin. Sel endokrin ghrelin terdistribusi di bagian basal mukosa lambung, terutama di bagian fundus.

Ucapan terima kasih

Publikasi ini merupakan sebagian dari hasil

Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Gadjah Mada yang dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi tahun 2013, berdasarkan surat kontrak Nomor LPPM-UGM/1378/LIT/2013.

Daftar pustaka

- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, dan Nakao K, 2001. *Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab. 86:4753-4758.
- Cummings DE, 2006. *Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight*. Physiology & Behavior. 89:71-84.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, dan Nakazato M, 2000. *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans*. Endocrinology. 141:4255-4261.
- Dimaraki EV dan Jaffe CA, 2006. *Role of endogenous ghrelin in growth hormone secretion, appetite regulation and metabolism*. Rev Endocr Metab Disord. 7:237-249.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, dan Korbonits M, 2002. *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. J Clin Endocrinol Metab. 87:2988-91.
- Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, dan Flegal KM, 2004. *Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002*. JAMA. 291:2847-2850.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, dan Kangawa K, 1999. *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature. 402:656-660.
- Kojima M dan Kangawa K, 2002. *Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract*. Current Opinion in Pharmacology. 2:665-668.
- Kojima M, Hosoda H, dan Kangawa K, 2004. *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 18:517-530.
- Leite-Moreira AF dan Soares JB, 2007. *Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin*. Drug Discovery Today. 12:276-288.
- Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, dan Ghigo E, 2004. *Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin*. Endocr Rev. 25:426-57.
- Lewin KJ, 1986. *The endocrine cells of the gastrointestinal tract. The normal endocrine cells and their hyperplasias*. Pathol Annu. 21 Pt1:1-27.
- McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, dan Cummings DE, 2004. *Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls*. J Clin Endocrinol Metab. 89:1630-1635.
- Murray CD, Kamm MA, Bloom SR, dan Emmanuel AV, 2003. *Ghrelin for the Gastroenterologist: History and Potential*. Gastroenterology. 125:1492-1502.
- Östman J, Britton M, dan Jonsson E, 2004. *Treating and preventing obesity: an evidence-based review. The Swedish Council of Technology Assessment in Health Care (SBU), Weinheim, Wiley-VCH*.
- Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, dan Boyadjian R, 2002. *Insulin regulates plasma ghrelin concentration*. J Clin Endocrinol Metab. 87:3997-4000.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, dan Sakai T, 2002. *Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract*. Peptides. 23:531-6.
- Solcia E, Capella C, Vassallo G, dan Buffa R, 1975. *Endocrine cells of the gastric mucosa*. International Review of Cytology. 42:223-286.
- Solcia E, Rindi G, Buffa R, Fiocca R, dan Capella C, 2000. *Gastric endocrine cells: types, function and growth*. Regul Pept. 93:31-35.
- Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, dan Nakazato M, 2005. *Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis*. Regulatory Peptides. 126:11-19.
- Tschop M, Smiley DL, dan Heiman ML, 2000. *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature. 407:908-913.
- Westphal SA, 2008. *Obesity, abdominal obesity, and insulin resistance*. Clin Cornerstone. 9:23-31.