

Analisis Genetik Gen Leptin Berdasarkan Sekuen DNA GenBank dan Asosiasinya dengan Reproduksi Ternak Babi

(Genetic Analysis of the Leptin Gene Based on GenBank DNA Sequences and its Association with Pig Reproduction)

Cynthia Dewi Gaina^{1*}, Filphin Adolfin Amalo², Yustinus O. P. Wuhan¹

¹Laboratorium Klinik, Reproduksi, Patologi dan Nutrisi,
Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana

²Laboratorium Anatomi, Fisiologi, Farmakologi, dan Biokimia
Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana

*Korespondensi Email : cynthia.gaina@staf.undana.ac.id

ABSTRACT

*A candidate gene suspected of affecting pigs' reproductive traits is known as the leptin (LEP) gene. Based on the information found in Leptin GenBank's DNA sequence database, this research aimed to determine single nucleotide polymorphisms (SNPs) and changes in nucleotides and phylogenetic trees in pigs. The data from NCBI GenBank was used to obtain three different DNA sequences of the Leptin gene in pigs. The DNA sequence data for leptin were aligned using BioEdit to establish the sites of SNPs and alterations in nucleotides. A phylogenetic tree was constructed using Mega X. DNA sequences were, and the pig LEP gene was sequenced resulted in 11 SNPs. These findings are based on the sequence regions. The phylogenetic analysis revealed that the sequence of the Leptin gene in pigs (*Sus scrofa*) clustered more closely with that of goats (*Capra hircus*) than it did with the sequence of the LEP gene among the cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). The outcomes of this study can serve as a basis for more investigation into the connection between the LEP gene SNP and reproductive traits in pigs as one of potential genes for molecular selection.*

Keywords : *Leptin gene; Nucleotides; Pig; SNPs; Phylogenetic Tree*

PENDAHULUAN

Leptin (LEP) adalah protein hormon yang dihasilkan oleh jaringan lemak adiposa dan dikode oleh gen Leptin (LEP) atau dikenal sebagai Obesity Gen yang memiliki 16 kDa untuk berat molekulnya dengan 146 asam amino (Dornbush & Aeddula, 2021; Haruna *et al*, 2020; Grădinaru *et al* 2020). Gen LEP pada ternak babi berlokasi di kromosom 18 dengan

struktur gen leptin terdiri atas 3 ekson dan 2 intron (Balatsky *et al*, 2022; Sharma *et al*, 2023). Daerah intron 1 merupakan daerah *untranslated region* (UTR) yang tidak ditranskripsikan menjadi mRNA sehingga tidak terjadi translasi asam amino (Steri *et al*, 2018), sedangkan kodon dimulai pada ekson 2 dan kodon akhir ada pada ekson 3.

Gen LEP memengaruhi berat lahir, asupan nutrisi, keseimbangan energi, rasa kenyang, sistem kekebalan tubuh, dan fungsi reproduksi (Solé *et al*, 2021). Adanya ekspresi gen LEP juga ditemukan di beberapa bagian organ tubuh ternak babi, termasuk lemak punggung babi, organ hati, hipotalamus, otot *Longissimus dorsi* dan bagian diafragma babi *Cross Landrace*, dengan bagian terbesar dari ekspresi LEP ada pada lemak punggung babi (Perez-Montarelo *et al*, 2013); Perez-Montarelo *et al*, 2015). Selain itu, LEP juga ditemukan dibagian mukosa lambung, epitelium mammae, jaringan otot, plasenta, testis dan folikel rambut (Wahab *et al*, 2013).

Gen LEP mengatur pengeluaran hormon leptin yang memiliki banyak tingkat modulasi pada poros hipotalamus-hipofisa-gonad (Smolinska *et al*, 2013); (Priyadarshini *et al*, 2015). Dalam sistem saraf pusat, hipotalamus berhubungan dengan leptin untuk mengendalikan asupan nutrisi dan pengeluaran energi (Liu *et al*, 2018). Sejumlah penelitian telah mengevaluasi lokalisasi reseptor leptin *messenger RNA* (mRNA) dalam kelenjar hipotalamus beberapa spesies (Smolinska *et al*, 2013); Perez-Montarelo *et al*, 2015). Dalam sistem syaraf pusat, hipotalamus adalah target utama leptin yang akan berikatan dengan neuron Gonadotropin (GnRH) untuk menstimulasi pelepasan GnRH. Leptin yang dihasilkan oleh jaringan lemak adiposa akan berikatan dengan

GnRH untuk menstimulasi produksi FSH dan LH di hipofisa anterior (Slawrys & Gajewska, 2017). Hormon FSH dan LH mengatur ovulasi dan folikulogenesis. Ternak akan mengalami gejala estrus karena hormon estrogen yang dihasilkan oleh folikel-folikel tersebut (Rybska *et al*, 2018); (Lv *et al* 2019).

Pada ternak babi, leptin berfungsi sebagai modulator maturasi oosit dan perkembangan folikel pada ovarium. Peningkatan konsentrasi leptin diasosiasikan dengan onset pubertas pada beberapa babi dara (Rybska *et al*, 2018); (Kuehn *et al*, 2008). Selama pertumbuhan pre-pubertas babi dara terjadi peningkatan level konsentrasi serum leptin yang diikuti dengan peningkatan sekresi LH dan serum estrogen saat pubertas. Pengaruh leptin terhadap sekresi LH dihubungkan dengan dewasa kelamin dan awal pubertas pada ternak babi (Lents *et al*, 2020); (Takle *et al*, 2017). Melalui mekanisme terpusat di otak bagian hipotalamus, hormon leptin ini berfungsi menghubungkan antara jaringan adiposa dan sistem reproduksi dalam menyediakan dan mengatur kebutuhan energi untuk reproduksi dan kehamilan (Slawrys & Gajewska, 2017); Lents *et al*, 2020). Hewan yang mengalami insufisiensi hormon leptin akan mengalami keterlambatan dewasa kelamin, infertilitas disertai potensi obesitas. Introduksi leptin berpengaruh pada peningkatan massa atau ukuran rahim dan ovarium betina dan tingkat

kesuburan ternak (Lents *et al*, 2020); (Takle *et al*, 2017).

Adapun polimorfisme pada gen LEP dan gen reseptor LEP juga dikaitkan dengan lemak tubuh, efisiensi pakan, dan reproduksi babi (Muro *et al*, 2022). Keterkaitan genetik antara lemak tubuh dan umur pubertas dapat menjadi alternatif seleksi ternak babi yang masuk masa pubertas (Rybska *et al*, 2018); (Kuehn *et al*, 2008).

Alat bioinformatika seperti BioEdit, Mega X, dan *National Centre for Biotechnology* (NCBI) dapat digunakan untuk menganalisis sekuens DNA untuk analisis gen, termasuk gen LEP di beberapa spesies (Hall *et al*, 2011). Analisis gen

bertujuan untuk melakukan pencarian gen, penjajaran/alignment, analisis genom, dan pencarian pola gen (Raza *et al*, 2012). Adapun studi analisis genetik pada gen LEP babi pada penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi adanya polimorfisme nucleotide tunggal (*single nucleotide polymorphism*), perubahan nukleotida dan penentuan kekerabatan spesies dengan pohon filogenetik pada babi (*Sus scrofa*) yang dihubungkan dengan reproduksi ternak babi. Hasil penelitian ini menjadi studi awal (*preliminary*) khususnya untuk mengetahui hubungan antara gen SNP LEP dengan performa reproduksi babi.

MATERI DAN METODE

Tiga sekuen DNA gen LEP digunakan dari data GenBank NCBI. Sekuen tersebut termasuk GenBank dengan *Accession Number*, FJ154077.1, HF569075.1, dan HF569076.1. Urutan sekuen sampel yang disejajarkan dimulai dari basa ke 21-136 dengan total 115 bp.

Analisis genetik

Urutan DNA dari gen LEP disejajarkan menggunakan BioEdit versi 7.0.0 untuk mengidentifikasi adanya polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) pada gen babi leptin.

Selain itu, sekuen DNA gen LEP dijajarkan pada bagian ekson 2 dan 3 gen LEP untuk melakukan analisis perubahan asam amino. Selain itu, phylogenetic tree dibangun menggunakan fitur dari Mega X, dan sekuen DNA gen leptin sapi dan kambing digunakan sebagai outgroup. Penelitian ini menggunakan BLAST untuk mengidentifikasi enam sekuen gen leptin babi (*Sus scrofa*), tiga sekuen gen leptin kambing (*Capra hircus*), dan empat sekuen gen leptin sapi (*Bos indicus* dan *Bos Taurus*).

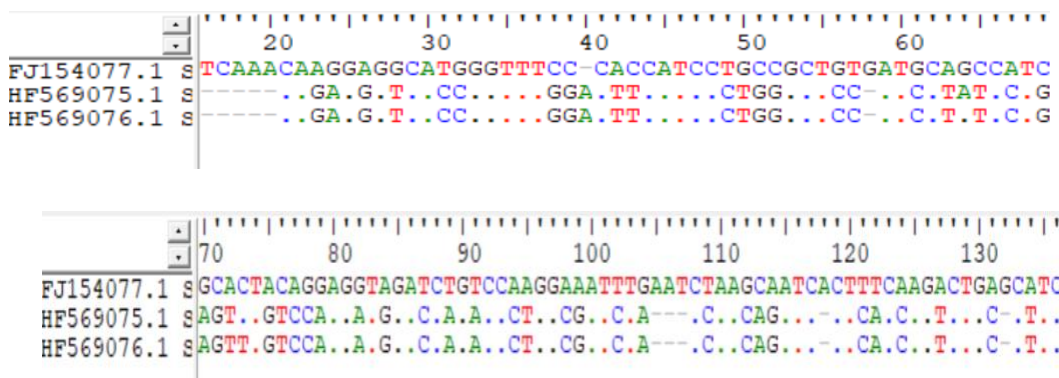
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dengan menggunakan BioEdit versi 7.0.0, sekuen DNA gen

LEP pada babi dapat disejajarkan (Gambar 1). Urutan sekuen sampel

yang disejajarkan dimulai dari basa ke 21-136 dengan total 115 bp. Hasil penyejajaran sekuensing ketiga sekuens DNA sampel dihomologikan dengan database genbank NCBI. Hasil yang didapatkan menunjukkan adanya mutase dalam bentuk delesi, insersi, transisi dan transversi. Dari hasil penyejajaran sekuens DNA gen LEP *Sus scrofa*, didapatkan adanya delesi pada semua sampel nukleotida ke 105-107, 118 dan 132. Selain itu, ditemukan adanya insersi pada

nukleotida ke 40. Adanya transisi ditemukan pada nukleotida ke 23,26, 75,84, 99, 114 (A →G); 24, 64,70,79,82, 104 (G→A); 31,49,57,87,102,109,121 (T→C); 43, 65, 73, 76 (C→T). Selain itu, ditemukan adanya transversi pada nukelotida ke 28 dan 50 (G→T); 32,56,61,78, 112 (G→C); 38,39,52, 69,71 (C→G); 42, 63, 72, 95, 127, 134 (A→T); 67,77,94, 98,124, 131 (A→C); 89,91, 122 (T→A); dan nukleotida ke 113 (C→A).



Gambar 1. Hasil penyejajaran basa nukleotida gen LEP Babi (*Sus scrofa*)

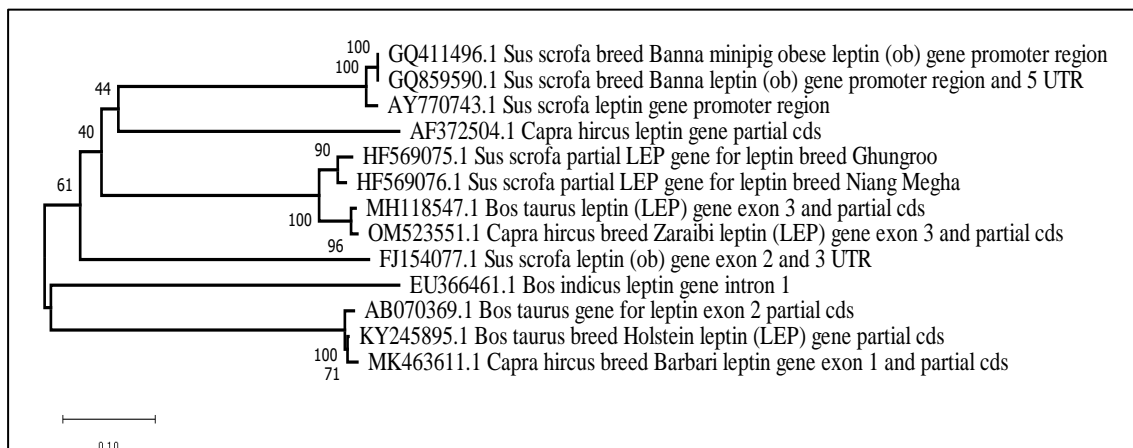
Berubahnya susunan basa nukleotida pada hasil sekuens DNA disebut juga mutasi (Aisah dkk, 2015). Mutasi adalah perubahan genetik, biasanya pada bagian gen atau kromosom, yang bersifat turunan. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya delesi, insersi, transisi dan transversi. Ketika pirimidin menggantikan pirimidin yang berbeda, atau perubahan purin oleh purin yang berbeda, mutase disebut transisi. Ketika pirimidin berubah menjadi purin atau sebaliknya, maka mutasi disebut transversi. Adanya pergantian basa nukleotida tersebut dapat mempengaruhi beberapa

susunan asam amino dan perubahan sekuens. Adanya delesi, transisi dan transversi pada basa nukleotida menyebabkan terjadinya perubahan pada susunan asam amino yang terbentuk (Aisah dkk., 2015; Jannah dkk., 2021).

Keseluruhan hasil mutasi baik berupa delesi, transisi dan transversi pada hasil analisa gen LEP ternak babi sejalan dengan data yang disajikan oleh Priyadarshini *et al.* (2015) yang membuktikan bahwa leptin mempengaruhi aksis hipotalamus- daerah hipofisis-gonad dan berpartisipasi dalam regulasi fungsi reproduksi babi. Dimana gen

LEP berperan penting dalam regulasi folikulogenesis dengan merangsang pengeluaran tiga hormon reproduksi yaitu LH, FSH dan GnRH. Adapun sel-sela pada ovarium yaitu, sel teka dan sel granulosa memiliki afinitas reseptor tinggi untuk leptin. Ovarium memiliki reseptor leptin terbanyak

dibanding organ lain pada ternak babi (Moreira *et al*, 2013); (Smolinska *et al*, 2013). Dalam hal ini leptin berfungsi sebagai modulator pematangan oosit dan perkembangan folikel pada ternak babi (Moreira *et al*, 2013); (Martins *et al*, 2021).



Gambar 2. Pohon filogenetik Gen LEP pada beberapa spesies hewan ternak

Gen LEP mempunyai pengaruh pada ovarium dengan cara menstimulasi proses pembentukan hormon steroid (steroidogenesis) melalui reseptor leptin di sel-sel granulosa ovarium (Moreira *et al*, 2013); (Smolinska *et al*, 2013). Gen LEP akan membantu babi dara untuk mencapai pubertas lebih cepat akan lebih subur sepanjang masa kawinnya, memiliki interval penyapihan hingga estrus yang lebih pendek, dan memiliki daya tahan lebih kuat saat paritas meningkat (Lents *et al*, 2020); (Takle *et al*, 2017). Sisi lain, Ersu (dkk 2020) menemukan bahwa walaupun polimorfisme gen LEP (SNP 1180 C>T) tidak mempengaruhi ukuran dan berat badan anak sapi saat lahir (p

< 0.05), Leptin dapat digunakan sebagai marka pembeda genotip antar spesies sapi. Adanya perubahan nukleotida C>T pada ekson 2 akan menyebabkan perubahan asam amino arginin menjadi sistein, sedangkan perubahan pada ekson 3 akan menyebabkan perubahan asam amino valin menjadi alanin. Perubahan asam amino akibat polimorfisme akan mengubah ekspresi protein. Demikian juga pada bagian intron, polimorfisme pada bagian intron berperan dalam regulasi proses transkripsi. Selain itu, dalam penelitian ini, BLAST digunakan pada tiga sekuen DNA gen LEP pada kambing, empat sekuen DNA gen LEP pada sapi, dan enam sekuen DNA gen LEP pada babi. Tabel 1

menunjukkan hasil analisis BLAST dengan persentase 98,18-100% kesamaan antar spesies pada variasi sekuens DNA gen LEP.

Tabel 1. Hasil Analisis BLAST GenBank dengan Accession no. FJ154077.1 dengan ke-12 Gen pembandingan

GenBank	Species	Query cover (%)	Kesamaan (%)
FJ154077.1	<i>Sus scrofa leptin (ob) gene, exon 2 and 3' UTR</i>	100	100
HF569075.1	<i>Sus scrofa partial LEP gene for leptin, breed Ghungroo</i>	100	100
HF569076.1	<i>Sus scrofa partial LEP gene for leptin, breed Niang Megha</i>	98,18	100
AY770743.1	<i>Sus scrofa leptin gene, promoter region</i>	100	100
GQ411496.1	<i>Sus scrofa breed Banna minipig obese leptin (ob) gene, promoter region</i>	100	100
GQ859590.1	<i>Sus scrofa breed Banna leptin (ob) gene, promoter region and 5' UTR</i>	100	100
EU366461.1	<i>Bos taurus ob gene for leptin, exons 2-3</i>	100	100
MH118547.1	<i>Bos taurus leptin (LEP) gene, exon 3 and partial cds</i>	100	100
AB070369.1	<i>Bos taurus gene for leptin, exon 2, partial cds</i>	100	100
KY245895.1	<i>Bos taurus breed Holstein leptin (LEP) gene, partial cds</i>	100	100
AF372504.1	<i>Capra hircus leptin gene, partial cds</i>	100	100
MK463611.1	<i>Leptin gene BG 4 clone from Capra hircus, encoding exon 2 and a partial cds</i>	100	100
MK463611.1	<i>Breed of Capra hircus Exon 1 in the barbari leptin (Leptin) gene and partial cds</i>	100	100

Topologi pohon filogeni berdasarkan gen LEP menunjukkan bahwa ada percabangan antar spesies ternak babi (*Sus scrofa*) (No. Asehi HF569075.1; dan HF569076.1)

dengan nilai *bootstrap* sebesar 90% berdasarkan nukleotida. Nilai bootsrat diatas $\geq 50\%$ menunjukkan adanya kekuatan percabangan pada spesies ternak babi (*Sus scrofa*).

Adapun hasil dari jarak genetik pada pohon filogeni pada Gambar 2 menunjukkan bahwa gen LEP pada *Sus scrofa* tidak menunjukkan percabangan yang berbeda antara kelompok *Sus scrofa* dengan kelompok *Bos taurus* dan *Capra*

hircus. Mutasi atau perubahan lokus gen dapat menyebabkan variasi sekuens nukleotida yang dapat menjadi cara untuk mengetahui keragaman dalam spesies dan antar spesies (Scarano & Rao, 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelusuran sekuens melalui data GenBank NCBI, maka ditemukan adanya 11 SNP gen leptin babi yang dapat diasosiasikan dengan

reproduksi ternak babi. Studi ini menunjukkan polimorfisme gen LEP sebagai awal penelitian lanjutan tentang marka gen LEP yang dapat bermanfaat bagi reproduksi ternak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterimakasih kepada LPPM Universitas Nusa tahun 2023 untuk hibah penelitian tahun 2023, FKKH Universitas Nusa

Cendana, dan Peternakan Babi Kota Kupang yang telah memberikan kontribusi data penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisah, I., Kurniadi, E., Carnia, E., & Ula, N. 2015. Representasi mutasi kode genetik standar berdasarkan basa nukleotida. *Jurnal Matematika Integratif ISSN, 1412, 6184.* <https://doi.org/10.24198/jmi.v11.n1.9399.25-34>
- Balatsky, V. N., Oliinychenko, Y. K., Saienko, A. M., Buslyk, T. V., Bankovska, I. B., Peka, M. Y., & Doran, O. 2022. Associations of Polymorphisms in Leptin and Leptin Receptor Genes with Meat Quality in Pigs of the Ukrainian Large White Breed. *Cytology and Genetics, 56(6):513-525.* DOI: 10.15407/agrisp3.02.042
- Laksa E. A., Hartatik, T., Panjono. Identifikasi Keragaman Gen Leptin serta Hubungannya dengan Berat Lahir Dan Ukuran Tubuh Sapi Potong. 2020. Skripsi. UGM.
- Grădinaru, A. C., Mizeranschi, A. E., Mihali, C. V., Neamț, R. I., Găină, V., Carabaș, M., & Ilie, D. E. 2020. Leptin gene polymorphism in Romanian cattle breeds and associations with milk production traits.

- Animal Biology & Animal Husbandry*, 12(2): 76-85.
- Hall, T., I. Biosciences & C. Carlsbad. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2:60–61.
- Haruna, I. L., Hadebe, S. A., Oladosu, O. J., Mahmoud, G., Zhou, H., & Hickford, J. G. 2020. Identification of novel nucleotide sequence variations in an extended region of the bovine leptin gene (LEP) across a variety of cattle breeds from New Zealand and Nigeria. *Archives Animal Breeding*, 63(2): 241-248. DOI: 10.5194/aab-63-241-2020
- Jannah, M., Sari, N. K., Mushlih, M., Hariri, M. R., Priyambodo, P., Pratiwi, R. H., & Awwanah, M. 2021. Metode Biologi Molekuler. Penerbit Widina.
- Kuehn, L. A., Nonneman, D. J., Klindt, J. M., & Wise, T. H. 2009. Genetic relationships of body composition, serum leptin, and age at puberty in gilts. *Journal of animal science*, 87(2): 477–483. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0936>
- Lents, C. A., Lindo, A. N., Hileman, S. M., & Nonneman, D. J. 2020. Physiological and genomic insight into neuroendocrine regulation of puberty in gilts. *Domestic Animal Endocrinology*, 73, 106446. DOI: 10.1016/j.domaniend.2020.106446
- Liu, J., Cao, S., Liu, M., Chen, L., & Zhang, H. 2018. A high nutrient dense diet alters hypothalamic gene expressions to influence energy intake in pigs born with low birth weight. *Scientific Reports*, 8(1): 1-12. DOI: 10.1038/s41598-018-23926-x
- Ly, D., Tan, T., Zhu, T., Wang, J., Zhang, S., Zhang, L., & Xing, Y. 2019. Leptin mediates the effects of melatonin on female reproduction in mammals. *Journal of Pineal Research*, 66(3), e12559. DOI: 10.1111/jpi.12559
- Martins, K. R., Haas, C. S., Rovani, M. T., Moreira, F., Goetten, A. L., Ferst, J. G., ... & Lucia Jr, T. 2021. Regulation and function of leptin during ovarian follicular development in cows. *Animal Reproduction Science*, 227, 106689. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106689>
- Muro, B. B., Carnevale, R. F., Leal, D. F., Almond, G. W., Monteiro, M. S., Poor, A. P., & Garbossa, C. A. 2022. The importance of optimal body condition to maximise reproductive health and perinatal outcomes in pigs. *Nutrition Research Reviews*, 1-21. DOI: 10.1016/j.nrr.2022.100001

- 10.1017/S0954422422000129
- Moreira, F., Corcini, C. D., Mondadori, R. G., Gevehr-Fernandes, C., Mendes, F. F., Araujo, E. G., & Lucia Jr, T. 2013. Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. *Animal reproduction science*, 139(1-4):89-94. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.03.011
- Perez-Montarelo, D., Fernandez, A., Barragan, C., Noguera, J. L., Folch, J. M., Rodríguez, M. C., & Fernandez, A. I. 2013. Transcriptional characterization of porcine leptin and leptin receptor genes. *PLoS One*, 8(6), e66398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066398>
- Perez-Montarelo, D., Rodríguez, M. C., Fernandez, A., Benitez, R., Garcia, F., Silio, L., & Fernandez, A. I. 2015. Haplotypic diversity of porcine LEP and LEPR genes involved in growth and fatness regulation. *Journal of applied genetics*, 56: 525-533. DOI: 10.1007/s13353-015-0284-7
- Priyadarshini, L., Yadav, A. K., Singh, H. S., Mishra, A., Jain, A. K., & Ahirwar, M. K. 2015. Role of leptin in physiology of animal reproduction-A review. *Agricultural Reviews*, 36(3): 235-240. DOI: 10.5958/0976-0741.2015.00027.6
- Raza, K. 2012. Application of data mining in bioinformatics. arXiv Prepr. arXiv1205.1125.
- Rybska, M., Knap, S., Jankowski, M., Jeseta, M., Bukowska, D., Antosik, P & Jaśkowski, J. M. 2018. Characteristic of factors influencing the proper course of folliculogenesis in mammals. *Medical Journal of Cell Biology*, 6(1): 33-38. <https://doi.org/10.2478/acb-2018-0006>
- Scarano, D., & Rao, R. 2014. DNA markers for food products authentication. *Diversity*, 6(3): 579-596. <https://doi.org/10.3390/d6030579>
- Sharma, M. V., Prabhakar Maurya, A., Pandey, R. R., Thakur, M. S., & Singh, S. N. 2023. Associations of exon 2 of leptin gene polymorphism with carcass traits in cross bred pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2006.00611.x
- Slawrys, G., & Gajewska, A. 2017. In vitro effect of leptin on anterior pituitary cells LH secretory activity during early pregnancy in pig. *Polish journal of veterinary sciences*, 20(1). DOI: 10.1515/pjvs-2017-0010
- Smolinska, N., Kaminski, T., Siawrys, G., & Przala, J. 2013.

- Expression of leptin and its receptor genes in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs. *Animal*, 7(1): 109-117.
<https://doi.org/10.1017/S1751731112001103>
- Solé, E., Ros-Freixedes, R., Tor, M., Reixach, J., Pena, R. N., & Estany, J. 2021. Antagonistic maternal and direct effects of the leptin receptor gene on body weight in pigs. *PLoS One*, 16(1), e0246198.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246198>
- Steri, M., Idda, M. L., Whalen, M. B., & Orrù, V. 2018. Genetic variants in mRNA untranslated regions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(4), e1474.
DOI: 10.1002/wrna.1474
- Takle, Z. J., & Legesse, T. G. 2017. The effect of leptin on the hypothalamic-pituitary gonadal axis and puberty. *International Journal of Health Sciences and Research* (7):332-344.
- Wahab, F., Atika, B., & Shahab, M. 2013. Kisspeptin as a link between metabolism and reproduction: evidences from rodent and primate studies. *Metabolism*, 62(7):898-910.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.015>.