

Pemanfaatan Nanoteknologi dalam Penghantaran Metformin: Kajian Formasi Fibrosis Hati Tikus Model Diabetes

Nanotechnology Utilization in Metformin Delivery: A Study of Liver Fibrosis Formation in Diabetic Rat Model

David Pakaya^{1*}, Jusrioktaviany Patandung², Sarifuddin Anwar³, Gabriella Bamba Ratih Lintin³,
Yuli Fitriana¹, Fauziah Amining¹, Mohammad Salman¹

¹Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

²Mahasiswa Prodi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

³Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

*E_mail: davidpakaya@gmail.com

Diterima: 14 Maret 2021

Direvisi: 31 Maret 2021

Disetujui: 3 Juni 2021

ABSTRACT

Metformin is a first-line diabetes therapy but has one of the side effects which is a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) that triggers the occurrence of fibrosis in the liver. Metformin nanoparticles can improve bioavailability and may reduce side effects. This study aims to analyze the effectiveness of metformin nanoparticle delivery through fasting blood glucose (FBG) levels and liver fibrosis in the diabetic rat model. This is experimental research with a post-test-only controlled group design. This study used 16 white male Wistar rats, 8 weeks of age, body weight (BW) 250-350 g. The streptozotocin (STZ) 40 mg/kg BW were injected i.p. Rats were divided into 4 groups; K1: normal control; K2: negative control (diabetes model); K3: diabetes model treated with metformin 100mg/kg BW; K4: diabetes model treated with nanoparticle metformin 100mg/kg BW. The BW and fasting blood glucose levels were conducted periodically. The histology of fibrosis was performed from Sirius Red staining of liver tissue and quantified using ImageJ software. The data were analyzed with GraphPad Prism 8.0.0 using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Metformin therapy decrease FBG levels on K3 starting on day 21 and K4 starting on day 7, but there was no statistical difference ($p=0.0597$). The areas of fibrosis were reduced ($p=0.002$). Metformin nanoparticles were able to decrease FBG levels and effectively reduce the formation of liver fibrosis in the diabetic rat model.

Keywords: diabetes, fibrosis, metformin, nanoparticles

ABSTRAK

Metformin merupakan terapi lini pertama diabetes, namun memiliki efek samping yaitu *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) yang memicu terjadinya fibrosis pada hati. Sediaan nanopartikel metformin dapat meningkatkan bioavailabilitas dan dapat mengurangi efek sampingnya. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis efektivitas penghantaran sediaan nanopartikel metformin terhadap kadar glukosa darah puasa (GDP) dan fibrosis hati pada tikus model diabetes. Penelitian ini merupakan eksperimen dengan *post-test only controlled group design*. Penelitian ini menggunakan 16 ekor tikus putih galur Wistar jantan, berusia 8 minggu, berat badan (BB) 250-350 g. Tikus diinjeksikan *streptozotocin* (STZ) dosis 40 mg/kg BB. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan; K1: kontrol normal; K2: kontrol negatif (model diabetes); K3: model diabetes + terapi metformin 100mg/kgBB; K4: model diabetes + terapi sediaan nanopartikel metformin 100mg/kg BB. Pengukuran BB dan GDP secara berkala. Area fibrosis didapatkan dari pewarnaan *Sirius Red* jaringan hati tikus, dan dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Data dianalisis dengan *GraphPad Prism 8.0.0* menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil penelitian ini menunjukkan terapi metformin menurunkan kadar GDP pada K3 mulai pada hari ke-21 dan K4 mulai hari ke-7, namun tidak berbeda secara statistik ($p=0,0597$). Luas area fibrosis mengecil ($p=0,002$). Kesimpulan penelitian ini sediaan nanopartikel metformin mampu menurunkan kadar GDP dan efektif mengurangi terbentuknya fibrosis hati pada tikus model diabetes.

Kata kunci: diabetes, fibrosis, metformin, nanopartikel

Pendahuluan

Penyakit Tidak Menular (PTM) merupakan penyebab yang mendominasi angka kematian di Indonesia. Pengaruh lingkungan, kemajuan teknologi, dan perubahan gaya hidup masyarakat menjadi penyebab utama meningkatnya kejadian PTM.¹

Diabetes melitus (DM) adalah gangguan metabolik kronis yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah (hiperglikemia), tingginya produksi insulin, tingginya resistensi insulin, dan intoleransi glukosa atau insulin.² DM merupakan salah satu penyakit dengan morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi. Patogenesis DM ditandai dengan kerusakan sel β pankreas atau gangguan sensitivitas insulin yang menyebabkan naiknya kadar glukosa darah.³

Pasien dapat mengalami komplikasi makrovaskuler maupun mikrovaskuler termasuk penyakit hati kronis. DM tipe 2 berhubungan dengan *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) yang dalam jangka panjang dapat menyebabkan fibrosis hati, sirosis, hingga penyakit hati stadium akhir. Pada suatu penelitian didapatkan jumlah penderita fibrosis hati ditemukan 231 (36,7%) kasus dari 629 pasien DM tipe 2.⁴

Metformin adalah antidiabetik oral golongan biguanid yang digunakan secara luas untuk terapi DM tipe 2. Metformin memiliki harga terjangkau, risiko hiperglikemia rendah, dan tidak menyebabkan kenaikan berat badan.⁵ Meskipun sangat jarang terjadi, metformin pernah dilaporkan menginduksi hepatotoksitas idiosinkratik.⁶ Hepatotoksitas ini dapat terjadi karena adanya reaksi hipersensitivitas sehingga sel-sel inflamasi akan mendominasi.⁷ Peningkatan reaksi inflamasi akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang akan mengaktifkan sel-sel stelata serta kematian hepatosit sehingga terjadi NAFLD.⁸

Nanopartikel memiliki peran penting untuk meningkatkan bioavailabilitas dan mengurangi efek samping obat.

Bioavailabilitas yang tinggi dapat mempertahankan kondisi terapeutik untuk waktu yang lebih lama dan mencapai komponen intrasel. Hal ini dapat mengurangi dosis, frekuensi pemberian, dan durasi pemberian obat.⁹ Penurunan pemberian dosis dan bentuk sediaan metformin menjadi nanopartikel akan berdampak pada kemungkinan penurunan efek samping terjadinya NAFLD. Tujuan penelitian ini untuk menilai efek sediaan nano metformin dalam menurunkan kadar glukosa darah dan formasi fibrosis pada hati tikus model diabetes.

Metode

Sampel Hewan Model

Penelitian ini merupakan eksperimental dengan *post-test only controlled group design*. Penelitian ini menggunakan 16 ekor tikus putih galur Wistar jantan, berusia 8 minggu dengan berat badan (BB) 250-350 g. Selain kelompok kontrol normal, tikus diinjeksikan *streptozotocin* (STZ) dosis 40 mg/kgBB, kadar glukosa darah puasa (GDP) tikus diukur 7 hari *pasca* injeksi STZ dan ditentukan mengalami diabetes. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan; K1: kontrol normal; K2: kontrol negatif (model diabetes); K3: model diabetes + terapi metformin 100mg/kgBB, setiap hari selama 4 minggu; K4: model diabetes + terapi sediaan nanopartikel metformin 100mg/kgBB, setiap hari selama 4 minggu. Pengukuran BB menggunakan timbangan *digital Camry* EK5055 dan kadar GDP menggunakan glukometer Nesco[®] dilakukan secara berkala pada setiap minggu sampai hari ke-28.

Seluruh hewan dilakukan adaptasi selama 7 hari dalam kandang individu berbahan plastik dengan penutup anyaman kawat. Kandang diletakkan ruang bersuhu 20-25°C dengan ventilasi baik. Selama penelitian hewan diberi pakan standar dan minum air *ad libitum*. Penelitian ini telah memperoleh izin dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan

Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako dengan nomor: 6507/UN 28.1.30/KL/2020.

Pewarnaan Histologi

Tikus diterminasi dan dinekropsi pada hari ke-28 *pasca* terdiagnosis DM. Jaringan dibuat dalam blok paraffin dan dipotong dengan ketebalan 5 μ m. Pewarnaan jaringan menggunakan *Sirius Red*. Pengamatan pada 5 lapang pandang dipilih secara acak dan tidak tumpang tindih dengan menggunakan mikroskop cahaya $\text{\textcircled{R}}$ Olympus CX23 perbesaran 400 \times , *numerical aperture* (NA) 1,25. Perangkat lunak yang digunakan adalah $\text{\textcircled{R}}$ Optilab. Hasil gambar dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak *ImageJ*.

Analisis Statistik

Data dianalisis dengan *GrapPhad Prism 8.0.0* menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

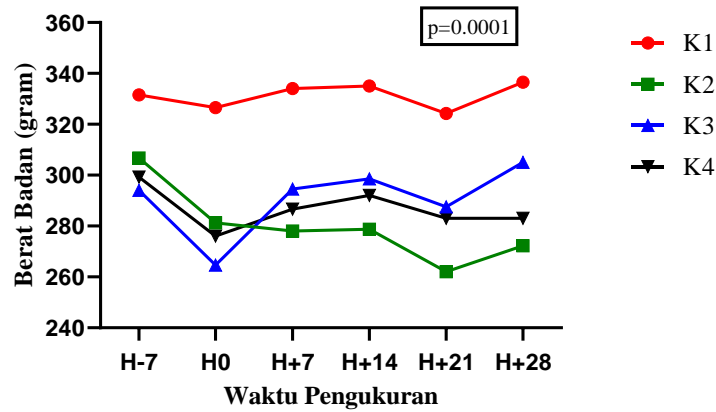
Hasil

Berat badan dan kadar GDP Tikus Model Diabetes

Dari 4 kelompok perlakuan tikus yang dirawat sampai hari ke-28 *pasca* hiperglikemia, rerata BB tikus pada awal penelitian H-7 (sebelum induksi STZ) didapatkan berkisar antara $294 \pm 43,64$ sampai $331,5 \pm 37,72$ g (Gambar 1). Pada kelompok perlakuan K1 BB tikus cenderung stabil mulai awal sampai akhir penelitian (H+28). Pada kelompok K2, K3, dan K4 yang diinduksi STZ memperlihatkan adanya penurunan BB pada H0 saat terdiagnosis diabetes. Pada K2 didapatkan BB tikus menurun menjadi $281,25 \pm 16,01$ g, K3 turun menjadi $264,67 \pm 30,08$ g, dan K4 turun menjadi $276 \pm 16,25$ g. Pada kelompok K2, BB terus menurun hingga akhir penelitian sampai

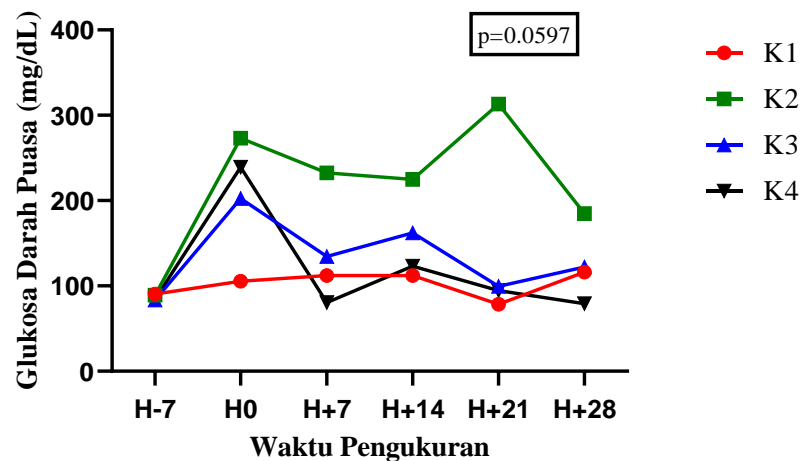
$272,25 \pm 56,01$ g. Kelompok K3 dan K4 memiliki rerata BB yang cenderung stabil sampai akhir penelitian dengan rerata $305 \pm 15,55$ g dan $283 \pm 7,54$ g. Pada uji *One Way Anova* rerata BB didapatkan perubahan yang bermakna pada setiap kelompok pada setiap waktu pengukuran ($p=0,0001$).

Pada awal penelitian H-7 (sebelum induksi STZ) didapatkan rerata kadar GDP berkisar antara $82,75 \pm 6,7$ sampai $90,5 \pm 12,79$ mg/dL (Gambar 2). Pada kelompok K2, K3, dan K4 yang diinduksi STZ memperlihatkan adanya peningkatan kadar GDP dari keadaan normal (nilai rujukan = ≤ 126 mg/dL)^{8,9} pada 7 hari *pasca* induksi STZ (H0). Pada kelompok K1 rerata kadar GDP $105,5 \pm 29,56$ mg/dL, K2 didapatkan $273 \pm 176,11$ mg/dL, K3 didapatkan $202,33 \pm 48,19$ mg/dL, dan K4 didapatkan $239 \pm 190,6$ mg/dL. Pada kelompok K1 rerata kadar GDP tampak stabil dalam keadaan normal pada setiap waktu pengukuran sampai H+28 dan didapatkan $116,25 \pm 25,61$ mg/dL pada akhir penelitian. Pada K2 rerata kadar GDP terus berada diatas nilai rujukan dan pada H+28 didapatkan GDP $184,75 \pm 76,02$ mg/dL. Pada kelompok K3 dan K4 terjadi penurunan rerata kadar GDP mulai pada H+7. Pada kelompok K3 penurunan berlangsung secara perlahan dan baru mencapai nilai normal setelah H+21. Pada H+28 didapatkan rerata $122 \pm 11,31$ mg/dL. Pada kelompok K4 penurunan kadar GDP dimulai pada H+7 dan cenderung stabil sampai pada H+28 dengan rerata $79 \pm 15,39$ mg/dL. Pada Uji statistik *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan rerata GDP yang tidak bermakna pada setiap kelompok pada setiap waktu pengukuran ($p=0,0597$).



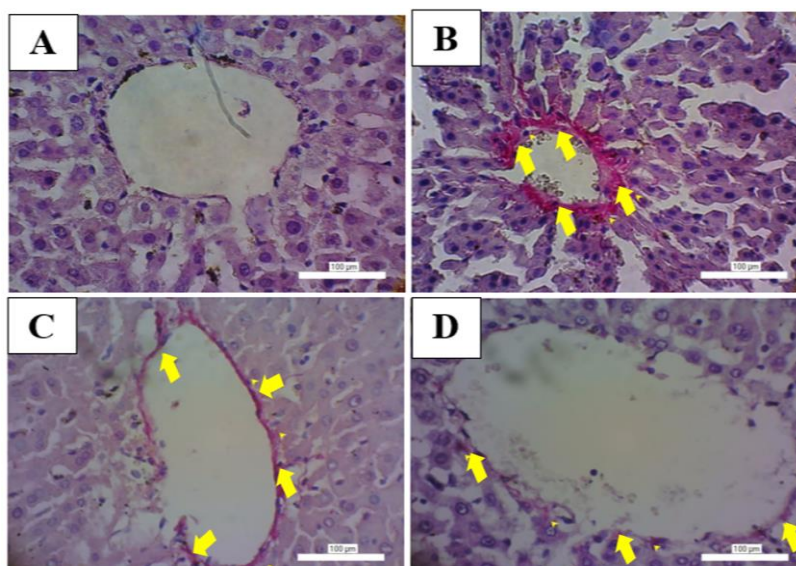
Gambar 1. Rerata berat badan tikus per kelompok perlakuan

Keterangan: K1: Kelompok kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model diabetes; K3: Kelompok tikus model diabetes dengan terapi metformin; K4: Kelompok tikus model diabetes dengan terapi sediaan nano metformin. H-7: Pre Induksi STZ; H0: hari diagnosis diabetes; H+7: 7 hari *pasca* diabetes; H+14: 14 hari *pasca* diabetes; H+21: 21 hari *pasca* diabetes; H+28: 28 hari *pasca* diabetes.



Gambar 2. Rerata kadar GDP tikus per kelompok perlakuan

Keterangan: K1: Kelompok kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model diabetes; K3: Kelompok tikus model diabetes dengan terapi metformin; K4: Kelompok tikus model diabetes dengan terapi sediaan nano metformin. H-7: Pre Induksi STZ; H0: hari diagnosis diabetes; H+7: 7 hari *pasca* diabetes; H+14: 14 hari *pasca* diabetes; H+21: 21 hari *pasca* diabetes; H+28: 28 hari *pasca* diabetes.

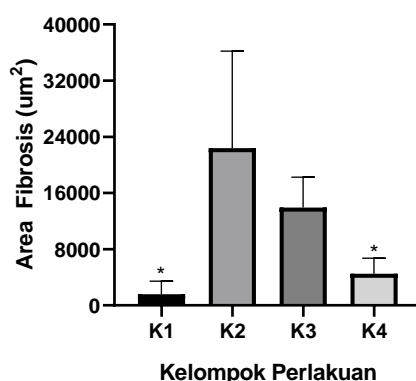


Gambar 3. Gambaran histopatologis fibrosis hati tikus model diabetes *pasca* perlakuan hari ke-28, dengan pewarnaan Sirius Red. Keterangan: (A) Kelompok K1, (B) Kelompok K2, (C) Kelompok K3, (D) Kelompok K4. Panah kuning menunjukkan jaringan fibrosis (Perbesaran 400x dan skala 100 µm).

Gambaran Fibrosis Hati

Gambaran area fibrosis pada jaringan hati (Gambar 3) menunjukkan bahwa pada kelompok K1 menunjukkan area fibrosis yang sangat sedikit (3A). Kelompok K2 memiliki area fibrosis yang luas bila dibandingkan ketiga kelompok lain (3B).

Deskripsi area fibrosis kelompok K3 yang menunjukkan luas area fibrosis lebih kecil dari kelompok K2 (3C), sedangkan area fibrosis pada jaringan hati kelompok K4 menyerupai kondisi normal pada kelompok K1, dan lebih baik dibandingkan K3 (3D).



Gambar 4. Luas area fibrosis

Keterangan: K1: Kelompok kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model diabetes; K3: Kelompok tikus model diabetes dengan terapi metformin; K4: Kelompok tikus model diabetes dengan terapi sediaan nano metformin. Uji *Kruskal Wallis* $p=0,0001$. Uji *post-hoc Mann Whitney*: K1 vs K2 ($p=0,021$), K1 vs K3 ($p=0,064$), K1 vs K4 ($p=0,157$), K2 vs K3 ($p=0,643$), K2 vs K4 ($p=0,034$), K3 vs K4 ($p=0,083$). * $p<0,05$ vs K2

Hasil pengukuran luas area fibrosis pada kelompok K1 adalah $1.573,57 \pm$

$1.871,34 \mu\text{m}^2$ (Gambar 4). Pada kelompok K2 memiliki area fibrosis yang paling luas

yaitu $22.384,95 \pm 13.804 \mu\text{m}^2$. Pada kelompok K4 memiliki area fibrosis yang lebih kecil yaitu $4.515,67 \pm 2.212,95 \mu\text{m}^2$ dibandingkan kelompok K3 yaitu $13.926 \pm 4.311,09 \mu\text{m}^2$. Uji non-parametrik menggunakan *Kruskal-Wallis* didapatkan perbedaan luas area fibrosis yang signifikan dari setiap kelompok ($p=0,022$). Hasil ini kemudian dilakukan uji lanjut *post-hoc Mann Whitney* dan didapatkan hasil yang berbeda signifikan antara kelompok K1 dan K2 ($p=0,021$), serta K2 dan K4 ($p=0,034$).

Pembahasan

Pada penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar yang diinduksi diabetes menggunakan agen diabetogenik STZ. STZ termasuk dalam derivat nitrosuria yang digunakan sebagai agen diabetogenik. Agen ini masuk melalui transporter glukosa GLUT 2 ke dalam sel β pankreas kemudian menginduksi perubahan *deoxyribonucleic acid* (DNA). Akibatnya sel β menjadi rusak, namun tidak mempengaruhi sel lain secara signifikan. STZ menjadi donor *nitric oxide* (NO) saat dimetabolisme oleh sel, sehingga terjadi peningkatan oksigen reaktif di mitokondria, yang berefek menghambat siklus Krebs, menurunkan konsumsi oksigen, produksi *adenosine triphosphate* (ATP), dan nukleotida pada sel β pancreas¹⁰¹¹.

Pada pemeriksaan BB yang dilakukan setiap minggu didapatkan penurunan berat badan pada tikus yang diinduksi diabetes, yaitu tikus kelompok K2, K3, dan K4. Tikus kelompok K2 yang tidak diberikan terapi metformin terus mengalami penurunan berat badan hingga H+28. Pada tikus kelompok K3 dan K4 yang diberikan terapi metformin cenderung stabil hingga akhir penelitian. Tikus dengan kondisi diabetes dapat mengalami penurunan berat badan hingga 22%. Tikus yang diberikan metformin cenderung stabil karena metformin dapat mencegah penurunan berat badan.¹²

Pada pemeriksaan kadar GDP H+7, kelompok K2 memiliki kadar GDP diatas nilai rujukan hingga akhir penelitian, sedangkan pada kelompok K3 dan K4 yang diberikan terapi metformin mengalami penurunan GDP. Pada hati, metformin menghambat glukoneogenesis terutama dengan menghambat rantai respirasi kompleks 1. Hal ini dapat mencegah pembentukan ATP yang mengakibatkan peningkatan ADP dan AMP. Kondisi ini menyebabkan kurangnya energi untuk glukoneogenesis. Peningkatan ADP dan AMP juga memberikan efek aktivasi *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK). Metformin juga meningkatkan penyerapan glukosa pada jaringan perifer (otot skeletal) sehingga mengurangi resistensi insulin. Hal ini terjadi melalui peningkatan GLUT4.¹³

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan rerata kadar GDP secara klinis namun tidak bermakna secara statistik ($p=0,0597$). Pada kelompok K4 yang diberikan terapi nano metformin cenderung mengalami penurunan GDP yang stabil hingga akhir penelitian, sedangkan kelompok K3 yang diberikan terapi metformin biasa stabil pada H+21. Sediaan nano metformin dapat menurunkan kadar gula darah pada kondisi hiperglikemia sebesar 60,69%, sedangkan pada terapi metformin biasa dapat menurunkan kadar gula darah sebesar 41,75%. Penggunaan nanoteknologi pada sediaan obat dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dibandingkan dengan pemberian secara konvensional. Bioavailabilitas yang tinggi dapat mempertahankan konsentrasi terapeutik lebih lama.¹⁴

Pada pengukuran area fibrosis didapatkan adanya perbedaan signifikan ($p=0,022$). Pada kelompok K2 (kontrol negatif) memiliki area fibrosis paling luas. Pada kelompok K3 dan K4 yang diberikan terapi metformin memiliki area fibrosis yang lebih kecil dibandingkan kelompok

K2. Pada uji lanjut *Mann Whitney* kelompok K3 dan K4 didapatkan hasil tidak bermakna ($p=0,083$). Meskipun demikian, pada kelompok K4 menunjukkan area fibrosis yang lebih kecil dibandingkan kelompok K3. Metformin dapat secara signifikan mengurangi fibrosis yang ditandai dengan menurunnya ekspresi *transforming growth factor beta* (TGF- β 1) pada jaringan hati tikus dengan DM tipe 2.¹⁵ Penelitian lainnya mengatakan bahwa metformin dapat menurunkan aktivitas sel stelata hepatic, mengurangi deposisi matriks ekstraselular, dan menghambat angiogenesis pada tikus yang diinduksi fibrosis. Aktivasi AMPK menghambat proliferasi dan migrasi sel stelata hepatic.¹⁶ Aktivasi AMPK memberikan efek antifibrosis dengan menghambat TGF- β 1 sehingga menekan aktivitas sel stelata hepatic. Metformin juga dapat menurunkan smad3 yang akan mengaktifasi TGF- β 1.¹⁷

Nanopartikel dapat melindungi obat dari degradasi enzimatis pada saluran pencernaan dan meningkatkan bioavailabilitas obat. Pada sediaan nano metformin memiliki ukuran partikel yang sangat kecil dan luas permukaan yang lebih besar sehingga dapat meningkatkan absorpsi obat pada usus.¹⁸ Pada penelitian ini menggunakan kitosan sebagai polimer karena sifat *biodegradabel*, *biokompatibilitas*, dan *mukoadhesif*.¹⁹ Nanopartikel mukoadhesif dapat melekat pada membran mukus dan melepas obat secara perlahan sehingga berpotensi mengurangi frekuensi pemberian obat. Penyerapan obat ke sirkulasi sistemik dapat tercapai dengan membuka *tight junction* pada membran usus secara sementara oleh polimer kitosan. Hal ini juga dapat meningkatkan bioavailabilitas sediaan nanopartikel.¹⁸

Pada penelitian ini terdapat adanya keterbatasan pada penggunaan STZ yang menginduksi kerusakan sel β tidak disertai pemeriksaan insulin. Pembuatan tikus model diabetes untuk menganalisis fibrosis

hati melalui jalur inflamasi perlu waktu yang lebih lama, tidak seperti penggunaan CC14 yang menjadi memicu fibrosis lebih cepat.

Kesimpulan

Sediaan nano metformin mampu menurunkan kadar GDP secara klinis namun tidak bermakna secara statistik ($p=0,0597$) dan efektif mengurangi terbentuknya fibrosis hati secara bermakna ($p=0,022$) pada tikus model diabetes.

Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat melakukan pemeriksaan kadar GD 2 jam *pasca prandial* atau HbA1c yang lebih sensitif untuk menilai resistensi insulin.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Tadulako dan Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako atas pendanaan penelitian melalui dana DIPA Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako tahun 2020.

Daftar Rujukan

1. Islamiana D, Rafsanjani I, Pramaningtyas D, Fauziyati A. Effect of High-Fat Diet on Systolic Blood Pressure in STZ-Induced Diabetic Adolescent Sprague Dawley Rats. *Adv Heal Sci Res.* 2020;33:69–74.
2. Nambirajan G, Karunanidhi K, Ganesan A, et al. Evaluation of antidiabetic activity of bud and flower of Avaram Senna T (*Cassia auriculata* L.) In high fat diet and streptozotocin induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 2019;18:1495–1506.
3. Sholikhah T, Wulandari S, Ariesta I, Hakim M, Hafizhan M. The hypoglycemic effects of tapak liman (*Elephantopus scaber* L) plant extract on albino rat (*Rattus norvegicus*) models of diabetes mellitus. *J Kedokt dan Kesehat Indones.* 2020;11(2):172–179.
4. Zhao H, Song X, Li Z, Wang X. Risk factors associated with nonalcohol fatty liver disease and fibrosis among patients

- with type 2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(37):1–5.
5. Bahrambeigi S, Bahman Y, Rahimi M, Vahid S-I. Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:1593–1601.
 6. Zheng L. Metformin as a Rare Cause of Drug-Induced Liver Injury, a Case Report and Literature Review. *Am J Ther.* 2016;23:e315–e317.
 7. Cinthya S, Pradipta I, Abdulah R. Penggunaan Obat Penginduksi Kerusakan Hati pada Pasien Rawat Inap Penyakit Hati. *J Farm Klin Indones.* 2012;1(2):43–48.
 8. Adiwinata R, Christianty F, Richard T, Edbert D. Tatalaksana Terkini Perlemakan Hati Non Alkoholik. *J Penyakit Dalam.* 2015;2:53–59.
 9. Cetin M, Sahin S. Microparticulate and nanoparticulate drug delivery systems for metformin hydrochloride. *Drug Deliv.* 2016;23(8):2796–2805.
 10. Nugroho F, Ginting R, Nurdiana. Kadar NF- K β Pankreas Tikus Model Type 2 Diabetes Mellitus dengan Pemberian Tepung Susu Sapi. *Indones J Hum Nutr.* 2015;2(2):91–100.
 11. Suryani N. Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni (*Swetenia mahagoni* Jacq) terhadap Penurunan Glukosa Darah dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Hasil Induksi MLD-STZ. *Jurkessia.* 2013;4(1):1–10.
 12. Chinnaiyan S, Karthikeyan D, Gadela V. Combined synergetic potential of metformin loaded pectin-chitosan biohybrids nanoparticle for NIDDM. *Int J Biol Macromol.* 2019;125:278–289.
 13. Janic M, Volcansek S, Lunder M, Janez A. Metformin: from mechanisms of action to advanced clinical use. *Zdr Vestn.* 2017;86:138–157.
 14. Alhalmi A, Alzubaidi N, Abdulmalik W. Current Advances In Nanotechnology For Delivery of Anti-Diabetic Drugs: A Review. *Int J Pharmacogn.* 2017;5(1):100–107.
 15. Qiang G-F, Zhang L, Yang X-Y, et al. Effect of metformin on the formation of hepatic fibrosis in type 2 diabetic rats. *Acta Pharm Sin.* 2010;45(6):801–806.
 16. Li Z, Ding Q, Ling L-P, et al. Metformin attenuates motility, contraction, and fibrogenic response of hepatic stellate cells in vivo and in vitro by activating AMP-activated protein kinase. *World J Gastroenterol.* 2017;24(7):819–832.
 17. Fan K, Wu K, Lin L, et al. Metformin mitigates carbon tetrachloride-induced TGF-b1/Smad3 signaling and liver fibrosis in mice. *Biomed Pharmacother.* 2017;90:421–426.
 18. Mohammed M, Syeda J, Wasan K, Wasan K. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2017;9(4):53.
 19. Chenthamara D, Subramaniam S, Ramakrishnan S, et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res.* 2019;23(20):1–29.