

Optimasi Konsentrasi Etil Selulosa dan Lama Pengadukan dalam Preparasi *Microspheres* Metformin Hidroklorida

Ninda Sukmaningrum, Lusya Oktora Ruma Kumala Sari dan Eka Deddy Irawan
Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Indonesia

Abstrak

Metformin hidroklorida (MH) merupakan obat pilihan pertama yang digunakan dalam terapi diabetes mellitus tipe 2, namun dapat menimbulkan efek samping pada saluran pencernaan sehingga MH tepat dipreparasi menjadi sediaan *microspheres*. Banyak faktor yang mempengaruhi hasil preparasi *microspheres* di antaranya adalah konsentrasi etil selulosa (EC) dan lama pengadukan yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi terbaik konsentrasi EC dan lama pengadukan yang dapat menghasilkan *microspheres* MH-EC dengan *entrapment efficiency* (EE) tertinggi menggunakan optimasi desain faktorial. MH digunakan sebagai bahan aktif, EC digunakan sebagai polimer serta *non-aqueous solvent evaporation method* sebagai teknik yang dipilih dalam preparasi *microspheres*. Hasilnya *microspheres* yang menggunakan konsentrasi EC sebanyak 4.500 mg dan lama pengadukan selama 2 jam menghasilkan EE sebesar $84,6 \pm 0,557\%$ dengan nilai verifikasi EE sebesar 98,1%, *drug loading* sebesar $12,7 \pm 0,173\%$ dan *yield* sebesar $95,1 \pm 0,612\%$. *Microspheres* memiliki bentuk sferis dan morfologi permukaan yang relatif halus dan cerah serta ukuran partikel sebesar $173,8 \pm 4,41\mu\text{m}$. Hasil analisis FTIR menunjukkan bahwa tidak ada perubahan gugus fungsi spesifik pada MH sebagai bahan aktif.

Kata kunci: *microspheres*, metformin hidroklorida, etil selulosa

Optimization of Ethyl Cellulose Concentration and Stirring Time on Metformin Hydrochloride Microspheres

Abstract

Metformin hydrochloride (MH) has been used as a first line for treatment of diabetes mellitus type 2. It could cause gastrointestinal side effects, therefore it is appropriate to be prepared as microspheres. Many factors affect the result of microspheres preparation, such as EC concentration and stirring time which used in preparation. This research was aimed to find the best composition of ethyl cellulose (EC) concentration and stirring time to produce MH-EC microspheres with the highest entrapment efficiency (EE) using factorial design optimization. MH was used as a drug, EC was used as a polymer and non-aqueous solvent evaporation method was chosen for technique of microspheres preparation. The result of microspheres preparation used 4,500 mg of EC and 2 hours stirring time produced $84.6 \pm 0.557\%$ EE, 98.1% EE verification, $12.7 \pm 0.173\%$ drug loading and $95.1 \pm 0.612\%$ yield. The microspheres had spherical structure and a relatively smooth and bright surface morphology. The particle size was $173.8 \pm 4.41\ \mu\text{m}$. FT-IR analysis indicated that there were no changes in the spesific functional groups on MH as an active substance.

Keywords: microspheres, metformin hydrochloride, ethyl cellulose

Korespondensi: Ninda Sukmaningrum
nindasukma1@gmail.com

Pendahuluan

Metformin hidroklorida (MH) adalah obat yang direkomendasikan *American Diabetic Association* dan *European Association for the Study of Diabetes* sebagai *first line* terapi diabetes mellitus tipe 2.¹ Umumnya dosis MH pada sediaan konvensional yang digunakan yaitu sebesar 500 mg untuk pemakaian 2-3 kali sehari atau 850 mg untuk pemakaian sekali atau dua kali sehari dengan bioavailabilitas sebesar 50%-60% dan waktu paruh yang pendek yaitu 1,5-4,5 jam.²

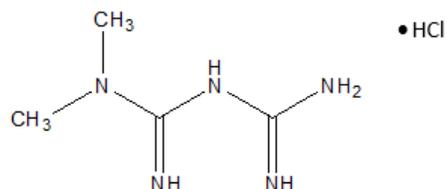
Penggunaan MH dengan dosis yang besar dan secara berulang memungkinkan terjadinya gangguan gastrointestinal dan toksisitas sebanyak 30%.³ Efek samping yang dapat ditimbulkan yaitu seperti perut terasa tidak nyaman, mual dan diare.⁴ Sebagai solusi dari permasalahan tersebut, maka dikembangkan sistem pelepasan obat terkendali yang dapat melepaskan obat secara perlahan pada saluran gastrointestinal sehingga akan memperpanjang durasi pelepasan obat dan meningkatkan kenyamanan pasien.⁵

Microspheres merupakan salah satu teknologi farmasi dalam sistem penghantaran obat terkendali yang menggunakan bahan polimer sebagai pembawa.⁶ *Microspheres* adalah partikel solid yang memiliki rentang ukuran 1-1.000 μm .⁷ Permukaan partikel *microspheres* yang memiliki pori-pori mampu melepaskan bahan aktif secara perlahan dan menghasilkan partikel dalam ukuran mikron.⁸

Metode *solvent evaporation* telah mendapatkan banyak perhatian dan lebih disukai dalam pembuatan *microspheres* untuk sistem penghantaran obat terkendali karena kemudahan dalam fabrikasi dan tanpa menurunkan aktivitas dari bahan aktif.⁹ Salah satu tipe dari metode *solvent evaporation* adalah *non-aqueous solvent evaporation*. Metode ini tidak menggunakan

air sebagai pelarut sehingga cocok digunakan sebagai metode pembuatan *microspheres* dengan bahan obat yang bersifat larut air. Preparasi *microspheres* dengan teknik *non aqueous solvent evaporation* menggunakan MH sebagai bahan aktif dan etil selulosa sebagai bahan polimer.⁷

Rumus molekul MH adalah $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5\cdot\text{HCl}$.¹⁰ Aksi dari MH yaitu meningkatkan sensitivitas insulin sehingga terjadi peningkatan *uptake* glukosa. Penggunaan MH dapat menurunkan kadar gula darah pasien sebesar 60 hingga 80 mg/dL, selain itu penggunaan MH juga tidak beresiko menimbulkan hipoglikemi.¹¹ Struktur MH dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Struktur MH mengandung gugus biguanida yang tersubstitusi dua gugus metil¹⁰

Etil selulosa (EC) merupakan polimer tak larut air yang banyak digunakan pada berbagai sediaan lepas lambat untuk bahan aktif yang larut air.⁷ EC banyak digunakan sebagai polimer dalam sediaan farmasi karena bersifat biokompatibel dan merupakan polimer selulosa yang non toksik.¹² EC bersifat mukoadesif dan secara luas digunakan sebagai bahan pembawa untuk berbagai bentuk sediaan serta diketahui stabil terhadap cahaya, panas, oksigen ataupun kelembaban.¹³

Entrapment efficiency (EE) merupakan salah satu faktor keberhasilan suatu preparasi *microspheres*. Nilai EE digunakan untuk menunjukkan seberapa besar jumlah obat yang terperap di dalam partikel *microspheres*. Banyak faktor yang mempengaruhi nilai EE.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Maji *et al.*⁷ dan Rathod *et al.*¹⁴ terdapat hubungan antara jumlah EC dan lama pengadukan yang digunakan terhadap nilai EE pada *microspheres* yang dihasilkan. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan optimasi konsentrasi EC dan lama pengadukan untuk memperoleh respon EE tertinggi.

Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah MH sebagai bahan aktif (Zenith Pharmaceutical), EC sebagai polimer (Lawsim Zecha), metanol sebagai fase internal (Brataco Chemika), aseton sebagai fase internal (Smart Lab. Indonesia), parafin cair sebagai fase eksternal (Brataco Chemika), dan petroleum eter sebagai agen pencuci (Brataco Chemika).

Penentuan jumlah formula yang akan dipreparasi dalam penelitian dilakukan menggunakan desain faktorial dua faktor dua *level*. Tiap formula memiliki jumlah bahan aktif yang sama, yang membedakan yaitu jumlah polimer EC yang digunakan dan lama pengadukan *four blades propeller* dalam preparasi *microspheres* MH. Pemilihan *level* rendah dan *level* tinggi pada masing-masing faktor ditentukan berdasarkan hasil penelitian sebelumnya. Preparasi *microspheres* MH-EC untuk masing-masing formula dapat dilihat pada Tabel 1.

Preparasi *microspheres* dengan metode *non-aqueous solvent evaporation* dilakukan dengan mencampurkan dispersi MH dalam 5 ml metanol dengan larutan EC dalam 24 ml aseton. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam 50 ml parafin cair yang mengandung span 80 2% v/v, kemudian dilakukan pengadukan menggunakan *four blades propeller* kecepatan 400 rpm pada suhu ruang. *Microspheres* yang terbentuk disaring dengan menggunakan penyaring vakum dilengkapi kertas *Whatman* no 1. Serbuk

microspheres yang terbentuk dicuci menggunakan petroleum eter suhu 50°C kemudian dikeringkan dalam oven suhu 60°C sampai didapatkan berat *microspheres* yang konstan.

Tabel 1 Preparasi *microspheres* MH-EC: (1) konsentrasi EC 1.500 mg dan pengadukan 2 jam; (A) konsentrasi EC 4.500 mg dan pengadukan 2 jam; (B) konsentrasi EC 1.500 mg dan pengadukan 4 jam; (AB) konsentrasi EC 4.500 mg dan pengadukan 4 jam

Formula	MH (mg)	EC (mg)	Lama pengadukan (jam)
1	750	1.500	2
A	750	4.500	2
B	750	1.500	4
AB	750	4.500	4

Sejumlah *microspheres* yang setara dengan 5 mg MH dibilas menggunakan akuades untuk menghilangkan MH bebas. *Microspheres* kemudian dihancurkan dalam mortir, dilarutkan dengan akuades sampai dengan 100 ml dan disaring. Filtrat selanjutnya diencerkan 10 kali dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 233 nm untuk menentukan konsentrasi obat. Cara penentuan EE yaitu dengan membandingkan konsentrasi obat sebenarnya dengan konsentrasi obat teoritis lalu dikali 100%.

Nilai EE yang diperoleh dari masing-masing formula dinyatakan sebagai respon yang diamati pada penelitian ini. Respon kemudian dimasukkan dalam *software design expert* 10.0.0.3 versi *trial* untuk mendapatkan formula optimum. Berdasarkan hasil pengolahan data dapat diketahui efek faktor serta interaksinya terhadap respon, kemudian untuk mengetahui komposisi optimum kombinasi konsentrasi EC dan lama pengadukan yang menghasilkan nilai EE

tertinggi dapat diketahui melalui *contour plot* dan *overlay plot*.

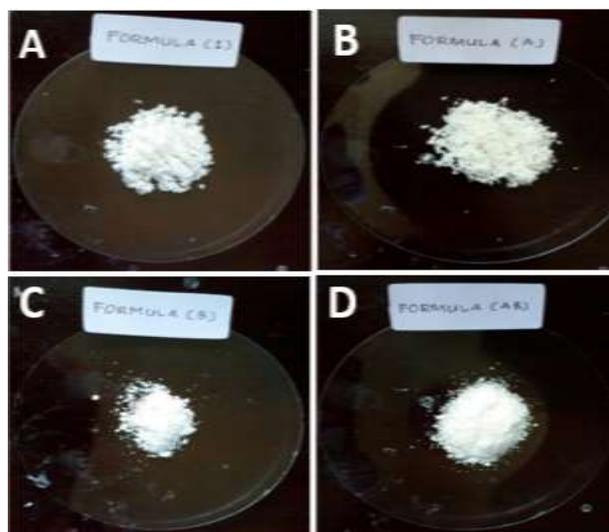
Formula optimum *microspheres* MH yang dihasilkan berdasarkan *software design expert* 10.0.0.3 versi *trial* selanjutnya dibuat. Verifikasi EE kemudian dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kemiripan EE hasil prediksi dengan hasil percobaan. Formula optimum selanjutnya dilakukan karakterisasi meliputi *drug loading* (DL), *yield*, analisis *fourier transform infrared* (FT-IR), dan *scanning electron microscopy* (SEM). Perhitungan DL yaitu dengan cara EE dikali berat MH sebenarnya dibagi dengan berat *microspheres* yang didapat lalu dikali 100%. Nilai *yield* didapat dengan cara membagi berat *microspheres* yang didapat dari hasil preparasi dengan berat *microspheres* teoritis lalu dikali 100%.

Analisis FT-IR menggunakan metode *Attenuated Total Reflectance* (ATR) dilakukan dengan meletakkan sampel *microspheres*, MH dan EC yang telah dihaluskan pada plat ATR. Pemeriksaan gugus fungsi dilakukan pada bilangan gelombang 400-4.000 cm^{-1} .

SEM dilakukan dengan meletakkan sejumlah *microspheres* disebar dan ditempelkan menggunakan selotip karbon pada bagian stub lalu ditempatkan di *scanning electron chamber*. *Scanning* dilakukan pada pembesaran yang berbeda-beda, maksimum 500 kali.

Hasil

Berdasarkan Gambar 2, *microspheres* MH yang dihasilkan menunjukkan bentuk yang hampir sama yaitu serbuk putih agak kekuningan. Hasil uji EE masing-masing formula ditunjukkan oleh Tabel 2.



Gambar 2 Hasil pembuatan empat formula *microspheres* MH-EC: (A) konsentrasi EC 1.500 mg dan pengadukan 2 jam; (B) konsentrasi EC 4.500 mg dan pengadukan 2 jam; (C) konsentrasi EC 1.500 mg dan pengadukan 4 jam; (D) konsentrasi EC 4.500 mg dan pengadukan 4 jam

Tabel 2 Hasil pengujian EE tiap formula

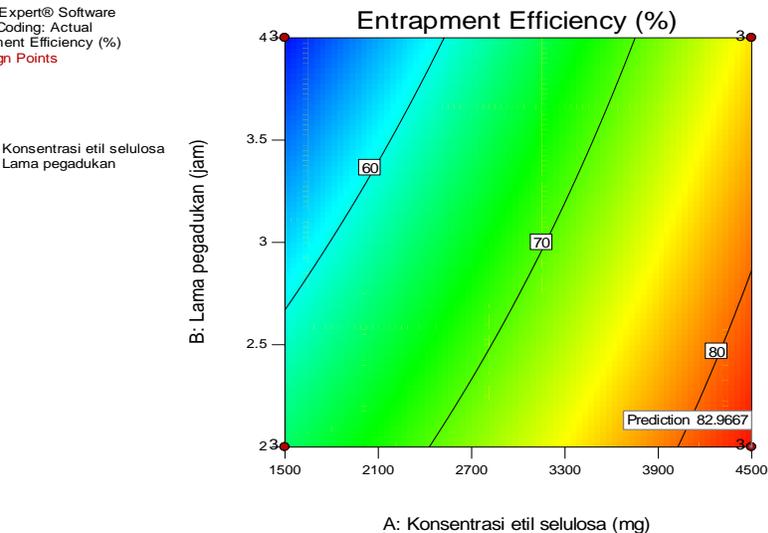
F	EC (mg)	Lama pengadukan (jam)	EE (%)
1	1.500	2	64,2 ± 0,264
A	4.500	2	83,0 ± 0,308
B	1.500	4	51,7 ± 0,453
AB	4.500	4	76,1 ± 0,529

*data disajikan dalam rerata ± SD (n=3)

Nilai EE dari masing-masing formula selanjutnya dimasukkan dalam *software design expert* 10.0.0.3 versi *trial* sehingga didapatkan Persamaan 1.

$$EE = +68,73 + 10,80*A - 4,85*B + 1,42*AB....(1)$$

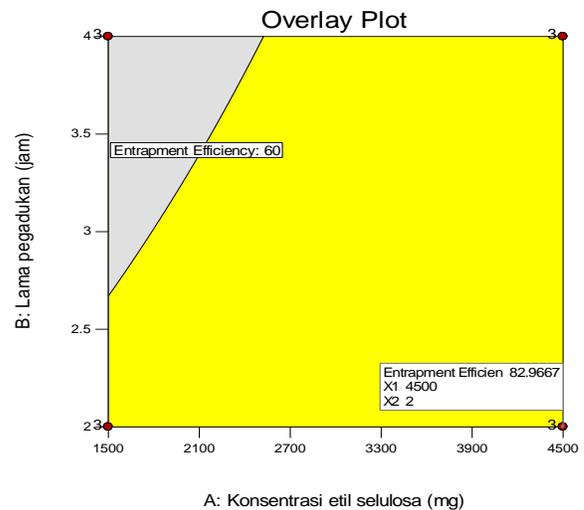
Software design expert 10.0.0.3 versi *trial* juga dapat memberikan *contour plot* dan *overlay plot*. Gambar *contour plot* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 *Contour plot* konsentrasi EC dan lama pengadukan terhadap EE

Contour plot menggambarkan efek konsentrasi EC dan lama pengadukan terhadap EE. Daerah yang berwarna biru memiliki EE prediksi yang paling rendah sedangkan daerah berwarna merah memiliki EE prediksi yang paling tinggi. Semakin banyak jumlah EC dan semakin rendah lama pengadukan yang digunakan maka akan meningkatkan nilai EE.

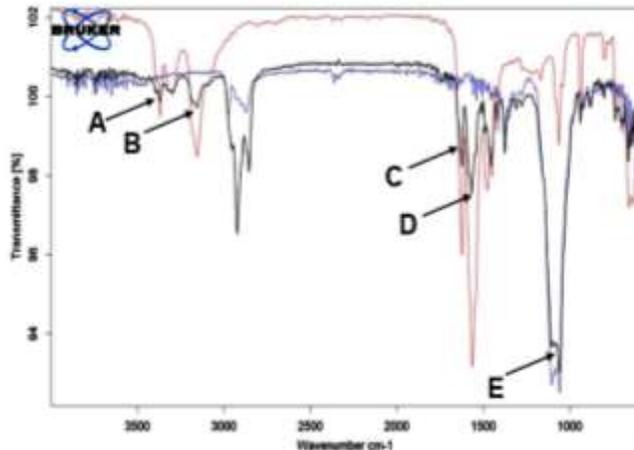
Grafik *overlay plot* digunakan untuk menentukan daerah optimum respon EE yang ditunjukkan oleh daerah berwarna abu-abu dan kuning. Respon EE di atas 60% didapatkan pada daerah berwarna kuning, sedangkan pada daerah berwarna abu-abu didapatkan respon EE di bawah 60%. Pada daerah warna kuning dapat dibuat *flag* di sembarang titik yang akan menampilkan jumlah EC dan lama pengadukan beserta respon yang dihasilkan pada titik tersebut. Gambar *overlay plot* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4 *Overlay plot* respon EE

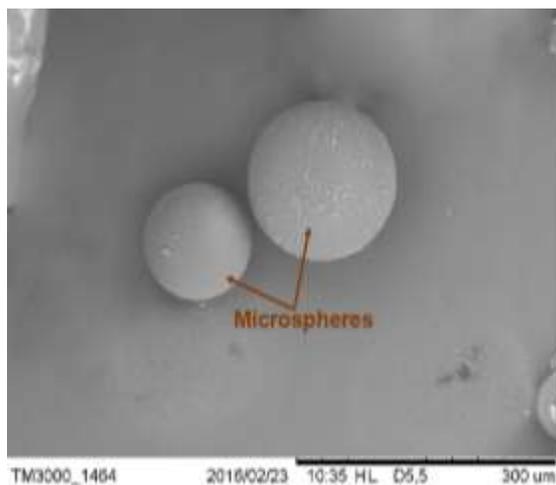
Hasil pengujian EE formula optimum terpilih yaitu menggunakan EC sebanyak 4.500 mg dan lama pengadukan 2 jam yaitu sebesar $84,6 \pm 0,557\%$, sedangkan EE hasil prediksi *software design expert* 10.0.0.3 versi *trial* adalah sebesar $82,9667\%$. Hasil verifikasi EE memberikan kemiripan sebesar 98,1%. Hasil karakterisasi formula optimum menunjukkan bahwa *microspheres* MH memiliki nilai DL dan *yield* masing-masing sebesar $12,7 \pm 0,173\%$ dan $95,1 \pm 0,612\%$.

Hasil analisis FT-IR menunjukkan bahwa tidak ada perubahan gugus fungsi pada MH ditandai dengan adanya kesamaan puncak yang khas pada MH murni yaitu N-H primer pada bilangan gelombang gelombang 3.369 cm^{-1} , N-H sekunder pada bilangan gelombang 3.158 cm^{-1} , N-H tekuk primer pada bilangan gelombang 1.626 cm^{-1} , N-H tekuk sekunder pada bilangan gelombang 1.567 cm^{-1} dan C-N pada bilangan gelombang 1060 cm^{-1} . Hasil analisis FT-IR *microspheres* MH-EC ditampilkan dalam Gambar 5.



Gambar 5 Hasil spektra FT-IR MH (merah), EC (biru) dan *microspheres* MH-EC (hitam) menunjukkan adanya gugus fungsi yang khas pada MH yaitu: (A) N-H primer pada 3.369 cm^{-1} ; (B) N-H sekunder pada 3.158 cm^{-1} ; (C) N-H tekuk primer pada 1.626 cm^{-1} ; (D) N-H tekuk sekunder pada 1.567 cm^{-1} ; (E) C-N pada 1.060 cm^{-1}

Hasil karakterisasi ukuran partikel, bentuk dan morfologi *microspheres* MH-EC menggunakan SEM didapat rerata ukuran partikel sebesar $173,8 \pm 4,41\ \mu\text{m}$. Morfologi *microspheres* MH-EC memiliki bentuk sferis, permukaan yang relatif halus, dan berwarna cerah. Morfologi *microspheres* dapat dilihat pada Gambar 6 dengan pembesaran 250x.



Gambar 6 Hasil analisis SEM dengan perbesaran 250x

Pembahasan

Hasil analisis *software design expert* 10.0.0.3 versi *trial* menunjukkan bahwa konsentrasi EC dan lama pengadukan serta interaksi keduanya memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon EE yang didapatkan. Hal ini ditunjukkan dari persamaan yang dihasilkan dan *contour plot* yang menggambarkan semakin lama pengadukan yang dilakukan maka terjadi pergeseran ke arah berwarna biru, yang menunjukkan daerah dengan respon EE paling rendah. Namun, semakin tinggi konsentrasi EC yang digunakan terjadi pergeseran ke arah berwarna merah, yang menunjukkan daerah dengan respon EE paling tinggi.

Konsentrasi EC dapat mempengaruhi nilai EE yang dihasilkan. Semakin banyak jumlah polimer yang digunakan akan menyebabkan peningkatan EE. Hal ini dikarenakan semakin banyak jumlah polimer EC yang digunakan maka akan meningkatkan kemampuan polimer tersebut dalam melingkupi bahan aktif. Polimer EC bertindak sebagai lapisan yang mencegah difusi bahan aktif ke fase eksternal.⁷ Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Garud *et al.*¹⁵ bahwa peningkatan jumlah EC dapat menyebabkan peningkatan nilai EE.

Lama pengadukan juga mempengaruhi EE yang dihasilkan oleh suatu *microspheres*. Pengadukan yang terlalu singkat menyebabkan proses emulsi untuk pembentukan *microspheres* belum sepenuhnya terjadi dan bahan aktif belum sepenuhnya terjerap dalam partikel *microspheres*. Sebaliknya, proses pengadukan yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan EE karena adanya penurunan ukuran partikel *microspheres* yang diperoleh. Penurunan ukuran partikel menyebabkan penurunan kemampuan *microspheres* dalam menjerap bahan aktif

sehingga akan menurunkan EE. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rathod *et al.* bahwa peningkatan lama pengadukan yang dilakukan dapat menurunkan nilai EE.¹⁴

Formula optimum terpilih yaitu formula dengan EE prediksi tertinggi. Berdasarkan Gambar 4. Dipilih formula optimum dengan faktor konsentrasi EC sebesar 4.500 mg dan faktor lama pengadukan 2 jam yang diprediksi menghasilkan EE sebesar 82,9667%. Hasil verifikasi EE formula optimum didapatkan hasil bahwa EE hasil percobaan memiliki nilai yang berdekatan dengan EE hasil prediksi.

Karakterisasi DL digunakan untuk menunjukkan seberapa efisien formula yang digunakan. DL yang didapatkan dari formula optimum memiliki nilai yang berdekatan dengan penelitian yang dilakukan oleh Maji *et al.*⁷

Karakterisasi *yield* digunakan untuk mengetahui seberapa efisien metode yang digunakan sehingga membantu menentukan metode pembuatan *microspheres* yang tepat. *Yield* yang mendekati 100% menunjukkan bahwa metode *non-aqueous solvent evaporation* yang digunakan dalam preparasi *microspheres* MH-EC menghasilkan jumlah *microspheres* yang maksimal dengan efisien. Hilangnya sebagian *microspheres* yang mengakibatkan penurunan *yield* dapat disebabkan oleh proses penyaringan yang kurang tepat.¹⁶

Analisis FT-IR pada Gambar 5 sehingga preparasi *microspheres* tidak mengganggu gugus spesifik dari MH. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Maji *et al.*⁷ bahwa preparasi *microspheres* MH-EC menunjukkan tidak adanya perubahan gugus fungsi yang khas pada MH.

Ukuran partikel *microspheres* yang terbentuk dipengaruhi oleh banyaknya EC yang digunakan. Semakin besar konsentrasi

EC yang digunakan akan memperbesar ukuran partikel *microspheres* yang terbentuk. Hasil penentuan ukuran partikel didapatkan bahwa *microspheres* MH-EC memiliki rata-rata ukuran partikel $173,8 \pm 4,41 \mu\text{m}$. Hal ini sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan bahwa *microspheres* adalah partikel dengan rentang ukuran 1-1.000 μm .¹⁷

Berdasarkan hasil karakterisasi tersebut maka preparasi *microspheres* MH-EC dengan metode *non-aqueous solvent evaporation* dapat dikatakan berhasil. Namun keberhasilan suatu preparasi *microspheres* juga perlu diikuti dengan pengujian bioavailabilitas *in vivo* dan *in vitro* untuk mengetahui keberhasilan *microspheres* sebagai sistem penghantaran obat terkendali. Selain itu juga perlu dilakukan pengujian mutu sediaan untuk mengetahui stabilitas sediaan *microspheres*.

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi EC dan lama pengadukan terbukti memiliki pengaruh yang signifikan pada nilai EE *microspheres* MH-EC yang dihasilkan. Kombinasi optimum antara konsentrasi EC dan lama pengadukan untuk memperoleh nilai EE maksimum adalah 4.500 mg dan 2 jam.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Zenith Pharmaceutical, Semarang, Indonesia dan PT. Lawsim Zecha, Jakarta, Indonesia yang telah memberikan bantuan bahan aktif metformin hidroklorida dan polimer etil selulosa pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus statement from

- the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diab Care*. 2009;32:193.
2. Pandit V, Pai RS, Yadav V, Devi K, Surekha B B, Inamdar MN, Suresh S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of floating microspheres of metformin hydrochloride. *Drug Dev Indian Pharm*. 2013;39(1):117–27.
 3. Ghodake JD, Vidhate JS, Shinde DA, Kadam AN. Formulation and evaluation of floating microspheres containing anti-diabetic (metformin hydrochloride) drug. *Int J Pharm Res*. 2010;2(1):378-384.
 4. Pilmore HL. Review: Metformin: Potential benefits and use in chronic kidney disease. *Asian Sos Neph*. 2010; 15:412-418.
 5. Badoni A, Ojha A , Gnanarajan G, Kothiyal P. Review on Gastro Retentive Drug Delivery System. *The Pharma Innovation*. 2012; 1(8):32-42.
 6. Behera AL, Patil SV, Sahoo SK. Formulation and characteristics of 5-fluorouran cil microspheres by solvent evaporation method. *Int J Pharm*. 2011;3(1):32-35.
 7. Maji R, Ray S, Das B, Nayak. Ethyl cellulose microparticles containing metformin hydrochloride by emulsification-solvent evaporation technique: effect of formulation variables. *Int Sci*. 2012;1-7.
 8. Sappidi S, Thadkala K, Kota J, Aukunuru J. Preparation and characterization of ethyl cellulose microspheres encapsulating metformin hydrochloride and glipizide. *Schol Res Lib*. 2014;6(4): 213–226.
 9. Li G, Liu G, Kang ET, Neoh KG, Yang X. Ph-responsive hollow polymeric microspheres from silica-polymer core shell microspheres. *Nankai Univ*. 2008;24(16):9050-9055.
 10. Sweetman SC. *Martindale 36th ed*. USA: Pharm Press; 2009.
 11. Wells BG, Dipiro JT, Schwinghammer TL, Dipiro CV. *Pharmacotherapy Handbook 9th ed*. USA: McGraw-Hill Education; 2015.
 12. Bagul U, Gujar K, Dhat S, Aphale S, Bhavsar M. In vitro study of mucoadhesive strength of polymers for mucoadhesive drug delivery systems. *Int J Pharm Res*. 2009;1(1):42-46.
 13. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of pharmaceutical excipient 6th ed*. London: Pharm Press and American Pharm; 2009.
 14. Rathod UC, Patel AK, Shah DA. Statistical evaluation and optimization of influence of stirring speed and polymer concentration on hollow microspheres of diltiazem hydrochloride. *Schol Res Lib*. 2012; 4(3):972–978.
 15. Garud N, Garud A. Preparation and in-vitro evaluation of metformin microspheres using non-aqueous solvent. *Topic J Pharm Res*. 2012 August;11(May):577–583.
 16. Yadav A, Jain DK. Formulation and evaluation of gastroretentive floating microballoons of antidiabetic drug. *Asian J Pharm Life Sci*. 2011;1(2): 101–112.
 17. Sahil K, Akanksha M, Premjeet S, Bilandi A, Kapoor B. Microsphere: A Review. *IJRPC*. 2011;1(4):1184-1198.