

Ekspresi Gen *Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1* Pada Sel Sinoviosit Osteoarthritis Grade IV Setelah Pemberian Diacerein

Vivi Sofia¹, Hirowati Ali², Rizki Rahmadian³, Fitri Amita⁴

Abstrak

Disease Modifying Osteoarthritis Drugs (DMOADs) merupakan agen yang dapat mencegah, menghambat perkembangan atau mengembalikan perubahan morfologi pada penderita osteoarthritis. Salah satu yang termasuk DMOADs ini adalah diacerein. Diacerein menstimulasi terbentuknya *Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1* (TIMP-1) pada percobaan hewan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penggunaan diacerein pada ekspresi gen TIMP-1 pada sel primer jaringan sinovial pasien osteoarthritis. Pada penelitian ini dilakukan penambahan diacerein pada sel primer jaringan sinovial grade 4. Ekspresi gen dilihat dengan menggunakan alat *Real Time* PCR dari sampel yang telah diinkubasi dalam kurun waktu 24 jam dan 48 jam, kemudian dibandingkan dengan kontrol menggunakan metode ΔC_T dengan GAPDH sebagai *housekeeping gene*. Dari hasil pengukuran ekspresi gen sampel 24 jam dan 48 jam didapatkan nilai berturut-turut 0,0179 dan 0,7423 dengan nilai kontrol 0,0005. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa pada inkubasi diacerein selama 24 jam mampu meningkatkan ekspresi gen TIMP-1 dengan peningkatan sebesar 5,87 kali dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan pada inkubasi selama 48 jam, diacerein mampu meningkatkan ekspresi gen TIMP-1 dengan peningkatan sebesar 1,53 kali jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa overekspresi gen TIMP-1 berkaitan dengan pemberian diacerein pada osteoarthritis.

Kata kunci: diacerein, osteoarthritis, tissue inhibitor metalloproteinase-1, jaringan sinovial

Abstract

Disease Modifying Osteoarthritis Drugs (DMOADs) are agents that could prevent, inhibit the progression of morphological changes or restore in patient with osteoarthritis. One of DMOADs is diacerein. Diacerein has effect increased *Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1* (TIMP-1) on animal model. The objective of this study was to explore the influence of diacerein on lowering gene expression TIMP-1 of primary cell in synovial tissues on the patient with osteoarthritis grade IV. This research was conducted with addition of diacerein in synovial tissues of primary cell grade 4. Gene expression of the samples that had been incubated for 24 hours and 48 hours were known by using *Real Time* PCR then those had been compared with the control using ΔC_T with gene reference method. Based on the result it can concluded that the value of gene expression of samples at 24 and 48 hours of incubation respectively were 0.0179 and 0.7423 with control value was 0.0005. Based on result of the research, it is known that 24 hours of incubation was increased gene expression of TIMP-1 more 5,87 times if compared with the control group, while that 48 hours of incubation was increased gene expression of TIMP-1 more 1, 53 times if compared with the control group. This research can be concluded that the over expression of TIMP-1 associated with the given Diacerein of the synoviocyte cell of osteoarthritis.

Keywords: diacerein, osteoarthritis, tissue inhibitor metalloproteinase-1, synovial tissues

Affiliasi penulis: 1. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, 2. Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas (FK Unand), 3. Bagian Bedah FK Unand, 4. Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Korespondensi: Vivi Sofia, Email: vi2_sophia@yahoo.co.id
Telp: 081328327140

PENDAHULUAN

Osteoarthritis lutut merupakan sekelompok kondisi heterogen pada sendi lutut yang ditandai dengan adanya proses degradasi, reparasi disertai inflamasi yang terjadi pada jaringan ikat, lapisan rawan sendi, sinovium dan tulang subkondral. Menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2004 diketahui bahwa prevalensi penderita osteoarthritis di dunia mencapai 151,4 juta jiwa dan sekitar 27,4 juta jiwa berada di kawasan Asia Tenggara. Data *World Health Organization* di Indonesia tercatat 8,1% penduduk mengalami gangguan OA dari total jumlah penduduk. Diperkirakan 1 sampai 2 juta orang lanjut usia di Indonesia menderita cacat karena osteoarthritis dan diketahui prevalensi penyakit osteoarthritis lutut pada pasien wanita berumur 75 tahun ke atas dapat mencapai 35% dari jumlah kasus yang ada.¹

Terapi yang dapat menyembuhkan osteoarthritis dengan hasil yang memuaskan belum ditemukan sampai saat ini.² Terapi farmakologi pada penatalaksanaan OA banyak menimbulkan masalah gangguan kesehatan baru akibat efek samping yang ditimbulkan dari pemakaian obat-obat jangka panjang, seperti halnya penggunaan *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID's) jangka panjang akan mengakibatkan tukak lambung dan gangguan fungsi ginjal. Untuk terapi non farmakologi berupa operasi pengganti sendi hanya dilakukan untuk penderita dengan OA yang berat dan tidak respon dengan pengobatan secara farmakologi.³

Pada tingkat molekuler, ketidakseimbangan antara aktivitas katabolik dan anabolik dimana respon injuri yang utama terjadi pada tulang rawan sendi mengakibatkan terjadinya osteoarthritis. Ekspresi dari beberapa gen yang terlibat dalam respon inflamasi dan degradasi kartilago, seperti *Interleukin 1* (IL-1), *Tumor Necrosis Factor Alfa* (TNF- α).⁴

Enzim yang bertanggung jawab terhadap degradasi kartilago adalah *Matrix Metalloproteinase* (MMP), enzim ini disekresi baik oleh sel sinovial maupun kondrosit dan digolongkan ke dalam tiga golongan umum, yaitu *collagenase*, stromelysin dan gelatinase. Beberapa keadaan seperti trauma atau jejas mekanik akan menginduksi pelepasan enzim degradasi, seperti stromelysin dan MMP lain.

Stromelysin mendegradasi proteoglikan, sedangkan MMP mendegradasi proteoglikan dan kolagen. MMP diproduksi oleh kondrosit, kemudian diaktifkan melalui kaskade yang melibatkan proteinase serin (aktivator plasminogen), radikal bebas dan beberapa MMP tipe membran yang berperan pada osteoarthritis yaitu MMP1, MMP3, MMP 9 dan MMP 13. MMP mempunyai kemampuan degradasi seluler secara lengkap, sehingga keberadaannya dikontrol secara ketat oleh inhibitorynya. Kaskade enzimatik ini dikontrol oleh berbagai inhibitor, termasuk *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* (TIMPs) dan inhibitor aktivator plasminogen. TIMPs umumnya berfungsi menghambat MMP, tidak dapat bekerja optimal karena di dalam rongga sendi ini cenderung bersifat asam oleh karena pengaruh stromelysin (pH 5,5), sementara TIMPs baru dapat bekerja optimal pada pH 7,5. Keseimbangan antara MMP dan TIMPs ini dikendalikan oleh IL-1. Saat enzim MMP melakukan aktivitas degradasi matriks, maka ditemukan pula kadar TIMPs yang meningkat, namun tidak cukup mengimbangi peningkatan dari hidrolisis enzim MMP tersebut, kegagalan kontrol inilah yang dapat menyebabkan osteoarthritis.⁵

Pada osteoarthritis, respon kondrosit akibat adanya perubahan biomekanikal dan biokimia yaitu berupa terbentuknya MMP-3 yang merupakan enzim degradatif yang tidak diimbangi oleh kerja inhibitorynya yaitu TIMPs, sehingga terjadilah pembentukan matriks dengan kualitas yang tidak baik. Perubahan pada tulang rawan ini akan menyebabkan juga perubahan pada tulang subkondral yaitu berupa penebalan dan peningkatan densitas mineral tulang yang secara radiologi akan terlihat pada daerah subkondral berupa sklerosis dan gambaran osteofit.⁶

TIMPs ini disekresikan oleh berbagai sel termasuk sel otot polos dan makrofag. Aktivasinya ditingkatkan oleh PDGF dan TGF- β . Aktivasi MMP dalam bentuk inaktif (*zymogen*) dapat terjadi di intraseluler dan pada permukaan sel dan di ruang ekstraseluler melalui aksi dari protease lain atau bahkan dari MMP sebelumnya yang sudah aktif.⁷ Beberapa upaya terapi lain juga dilakukan seperti penelitian mengenai *disease-modifying osteoarthritis drug* (DMOADs) untuk memperbaiki struktur dan

fungsi tulang rawan serta jaringan disekitarnya. Hasil penelitian sebelumnya, penggunaan DMOADs pada penderita osteoarthritis dapat memperlambat laju perkembangan penyakit, menghentikan perkembangan penyakit, regenerasi jaringan target dan bahkan mencegah perkembangan penyakit. Salah satu obat yang termasuk DMOADs (*Disease Modifying Osteoarthritis Drugs*) ini adalah diacerein. Diacerein pertama kali dirilis di Italia tahun 1970 yang merupakan di-asetat derivatif dari Rhein yaitu molekul dengan cincin anthraquinonic. Rhein memiliki sifat anti-inflamasi melalui penghambatan interleukin-1, sitokin yang sangat terlibat dalam proses degeneratif tulang rawan. Penghambatan ini telah dikonfirmasi pada penelitian sebelumnya baik pada model hewan percobaan atau pada kultur sel kondrosit.⁸

Sel primer merupakan sel yang diperoleh secara langsung dari pemisahan jaringan suatu organisme melalui pemotongan jaringan normal dan dikultur. Kultur primer ini hanya dapat dipertahankan dalam periode waktu tertentu. Keunggulannya adalah lingkungan (pH, suhu, nutrisi pertumbuhan) yang mudah diatur, dapat menggambarkan karakteristik sel, mudah diukur, dan lebih etis daripada menggunakan hewan percobaan. Kultur sel juga memiliki keterbatasan seperti mudah terkontaminasi, ketidakstabilan genetik dan fenotip, serta biaya pemeliharaan yang relatif mahal.⁹

Penelitian yang pernah dilakukan salah satunya adalah menggunakan sel primer lambung. Pembuatan kultur sel primer lambung ini dilakukan dengan cara mengisolasi kelenjar lambung dari jaringan perut yang sehat kemudian ditumbuhkan pada media yang mengandung matrigel dengan berbagai faktor pertumbuhan, regulator perkembangan dan inhibitor apoptosis untuk menghasilkan sel epitel lambung yang normal dan bertahan lama.¹⁰ Pada penelitian sel primer jaringan sinovial pada osteoarthritis dengan Hyaluronic Acid (HA) digunakan untuk melihat ekspresi gen *connective tissue growth factor* (CTGF), *transforming growth factor- β 1* (TGF β 1), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang terkait pada osteoarthritis.¹¹

Berdasarkan penjelasan diatas, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi gen *Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1* pada osteoarthritis lutut *grade IV* dengan menggunakan diacerein pada sel primer jaringan sinovial.

METODE

Isolasi Jaringan Sinovial

Isolasi jaringan sinovial diawali dengan pembuatan *aliquot primary cell culture* atau medium komplit yang berisi DMEM, 20% FBS, 1% Penstrep dan 1% fungizone pada tube 50 ml sebagai medium. Sampel yang telah di inkubasi selama 24 jam dipisahkan dengan menggunakan *cell strainer*, kemudian disentrifuse pada kecepatan 2000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Setelah disentrifuse akan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan bawah pelet dan lapisan atas supernatan. Lapisan supernatan dibuang sehingga hanya pelet yang tersisa. Kemudian pelet di dilusi dengan 1 ml medium. Pindahkan ke well dan tambah 2 ml medium pada well. Setelah selesai masukkan ke inkubator CO₂. Amati pertumbuhan sel 3 hari kemudian.

Penambahan diacerein pada sel

Sel yang telah dalam keadaan konfluens 70-80%, medium lama dibuang lalu duci dengan PBS. Setelah itu ditambahkan dengan diacerein 10 µg/ml dalam DMEM yang mengandung 1% penisilin-streptomisin dan 1% *fungizone*. Sebagai kontrol digunakan sel yang tidak ditambahkan diacerein.

Perhitungan Sel

Sel yang telah dilusi dan dihomegenisasi, diambil 10 µl dan ditetesi pada *hemocytometer*. Sel dihitung pada 1 mm *centre square* yang terdiri dari 25 *square* (tiap *square* terdiri dari 16 *square* yang lebih kecil) dan 4x1 mm *corner square*.

$$\text{Total sel/mL} = \text{rata-rata jumlah sel per square} \times 10^4$$

Desain Primer

Desain primer menggunakan *software* Primer Plus 3. Spesifikasi primer dinilai dengan program BLAST.

Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

RNA diekstraksi dari isolat jaringan sinovial pasien Osteoarthritis grade IV. Isolasi RNA menggunakan TRIZOL® *reagent literature*, Invitrogen Life Technologies. Pembuatan cDNA menggunakan *iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog)* pada alat *Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad)*.

Penentuan ekspresi TIMP-1

Gen TIMP-1 diamplifikasi dengan menggunakan LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR® Green Kit (Roche) menggunakan mesin Real Time PCR LightCycler® 2.0-Time PCR Sistem Real, Bio Rad®.

Tahapan kerja Real Time PCR terdiri dari 3 langkah, yaitu denaturasi template DNA, amplifikasi target dan *melting curve*. Suhu denaturasi ditetapkan pada 95°C pada tingkat denaturasi awal, denaturasi amplifikasi dan denaturasi *melting curve*, suhu *annealing* dioptimasi pada rentang 55,7-63,7°C selama 5 detik (optimum 57,3°C).

Tabel 1. Tahapan *real time* PCR

Denaturasi awal	95°C selama 10 menit
Amplifikasi DNA target	
Denaturasi	95°C selama 10 detik
Annealing	optimasi pada 55,7-63,7°C selama 5 detik (optimum 57,3°C)
Melting curve	65-95°C, naik 0,5°C setiap 5 detik

Konsentrasi primer 0,5 µM untuk masing-masing *Forward* dan *Reverse*.

Analisa Data

Hasil yang diperoleh diuji secara deskriptif.

HASIL

Jumlah Sel

Pertambahan jumlah sel dapat terlihat dari sesudah pengujian diacerein yaitu dengan jumlah sel

awal 1×10^4 sel/well, setelah pengujian diacerein 24 jam diperoleh jumlah sel $11,5 \times 10^4$ sel dan pada 48 jam $13,25 \times 10^4$.

Hasil konsentrasi isolasi RNA dari sel primer jaringan sinovial menggunakan alat *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* untuk setiap sampel adalah sampel 24 jam (47,7 ng/µL), sampel 48 jam (39,85 ng/µL), dan pada sampel kontrol (107,9 ng/µL).

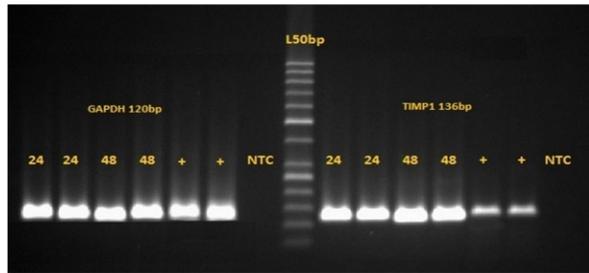
Desain primer dan amplifikasi gen target

Pada penelitian ini, tingkat ekspresi gen ditujukan kepada gen *Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1 (TIMP-1)* yang berperan pada patogenesis osteoarthritis. Berdasarkan data dari *Ensembl Genome Browser* diketahui bahwa TIMP-1 terletak kromosom Xp11.3 pada posisi 47.582.313-47.586.789. gen ini berukuran 624 bp.

Primer didesain dengan menggunakan *software* Primer 3 Plus. Sekuens primer diuji spesifitasnya dengan *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Hasil analisa elektroforesis dan *melting peak* pada grafik *Real Time* PCR menunjukkan hasil primer TIMP-1 adalah gen primer yang spesifik. *Housekeeping gene* yang digunakan pada penelitian ini adalah GAPDH. Amplifikasi cDNA menggunakan *iScript cDNA Syntesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog)* pada alat *Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad)*. Amplifikasi dilakukan dengan komposisi primer F + Primer R + cDNA + SYBR®Green + *iScript reverse reverse transcriptase* dan *Nuclease Free Water*. Siklus PCR terdiri dari denaturasi awal 95°C, dilanjutkan dengan 39 kali siklus amplifikasi, masing-masing dengan denaturasi 95°C selama 5 detik, *annealing* pada suhu 57,3°C.

Setelah dilakukan optimasi suhu untuk gen IL-1β dan gen GAPDH, diperoleh suhu optimum *annealing* gen TIMP-1 adalah 57,3°C, dan gen GAPDH adalah 60°C. Kedua gen ini bisa running bersamaan pada PCR *Real Time* karena selisih suhu tidak lebih dari 5°C. Primer yang digunakan spesifik untuk gen target dan suhu *annealing* yang digunakan sudah tepat. Proses ekstensi primer dilakukan pada suhu 72°C, karena suhu tersebut merupakan suhu optimum polimerase DNA untuk proses PCR.

Untuk memastikan bahwa gen TIMP-1 yang digunakan merupakan gen target yang spesifik maka dilakukan elektroforesis(Doc@Gel Electroforesis).



Gambar 1. Hasil elektroforesis gen TIMP-1

Tabel 2. Sekuens nukleotida gen TIMP-1 dan GAPDH

No	Gen	Sekuens nukleotida
1.	TIMP-1	F: 5'ATGGACTCTTGCACATCACTAC3' R: 5'GGGATGGATAAACAGGAAACA3'
2.	GAPDH	F: 5'ATGGGTGTGAACCATGAGAAGTA3' R: 5'GCCAGTGATGGCATGGAC3'

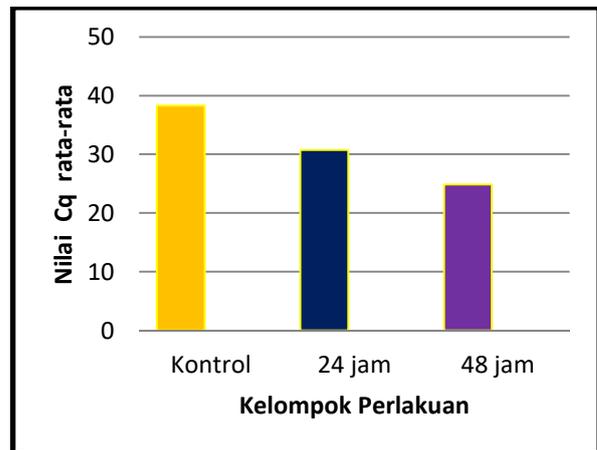
Tingkat ekspresi gen

Ekspresi gen dianalisa dengan membandingkan nilai Ct gen target dengan *housekeeping gene*, sedangkan data kuantitatif didasarkan pada jumlah kopi (*copy number*) yang didapatkan dari perhitungan ΔC_T . Analisa nilai ekspresi gen TIMP-1 dari *realtime* PCR menggunakan *relative quantification*. Metode ΔC_T dengan menggunakan gen referensi (Bio-Rad, 2000).

Ekspresi gen TIMP-1 diukur secara kuantitatif menggunakan *Real Time* PCR. Hasil dari reaksi *Real Time* PCR ini berupa nilai *Threshold cycle* (CT) yang menunjukkan siklus amplifikasi. Nilai C_T mean untuk masing-masing sampel yaitu sampel 24 jam (31,58), sampel 48 jam (25,68) dan sebagai kontrol (39,32). Dengan menggunakan metode ΔC_T dengan *housekeeping gene* diperoleh nilai ekspresi gen TIMP-1 untuk masing-masing sampel yaitu sampel 24 jam (0,01795), Sampel 48 jam (0,74226) dan yang sebagai kontrol (0,00054).

Tabel 3. Ekspresi gen TIMP-1 pada berbagai kelompok

Gen	kontrol	24 jam	48 jam
TIMP-1	38,31	30,71	24,84
GAPDH	28,45	25,78	24,25



Gambar 2. Proporsi overekspresi dari gen TIMP-1 pada berbagai kelompok

PEMBAHASAN

Osteoarthritis merupakan penyakit radang sendi yang paling banyak ditemukan di dunia. Osteoarthritis adalah penyebab disabilitas pada jutaan pasien, meliputi 60-70% orang yang berusia di atas 60 tahun. Kerusakan sendi menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara proses sintesis dengan proses degradasi atau penghancurannya.¹²

Proses degradasi tulang rawan pada kartilago sendi disebabkan karena terjadinya peningkatan beberapa jenis matriks metalloproteinase, antara lain agrekanase, kolagenase (seperti MMP1, 9, 13) dan gelatinase. *Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1* (TIMP-1) merupakan salah satu dari 4 famili TIMPS yang bekerja menghambat aktivitas enzim metalloproteinase yang merusak matriks tulang rawan sendi (kartilago) pada osteoarthritis. TIMP-1 merupakan regulator yang berperan penting pada proses *turn over* ekstraseluler matriks. Pada kasus osteoarthritis, semakin meningkatnya progresivitas penyakit osteoarthritis, maka ekspresi gen TIMP-1 akan menjadi

semakin menurun dan ekspresi gen MMPs akan semakin bertambah.¹³ Berdasarkan penelusuran pustaka, masih sangat jarang penelitian yang mengamati ekspresi gen TIMP-1 ini pada jaringan sinovial pasien osteoarthritis lutut grade 4 setelah pemberian diacerein yang merupakan salah satu obat osteoarthritis dari golongan *Disease Modifying Osteoarthritis Drugs* (DMOADs).

Penelitian ini didasarkan pada asumsi bahwa osteoarthritis berkaitan dengan penurunan ekspresi gen TIMP-1 yang berperan dalam menghambat aktivitas enzim MMP. Diacerein adalah salah satu obat DMOADs yang banyak digunakan dalam penatalaksanaan OA. Diharapkan dengan pemberian diacerein pada kultur sel sinoviosit secara *in vitro* dapat meningkatkan ekspresi dari gen TIMP-1.

Hasil penelitian memperlihatkan gambaran yang bersesuaian dengan hipotesis awal dimana terdapat peningkatan ekspresi gen TIMP-1 setelah pemberian diacerein 24 dan 48 jam setelah diinkubasi dengan sel primer sinoviosit. Rerata ΔC_T gen TIMP-1 adalah sebesar 30,71 setelah diinkubasi 24 jam dan sebesar 24,84 setelah inkubasi 48 jam. Angka ini lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol sebesar 38,31.

Ekspresi gen dilihat dengan menggunakan alat *Real Time* PCR dari sampel yang telah diinkubasi dalam kurun waktu 24 jam dan 48 jam yang kemudian dibandingkan dengan kontrol menggunakan metode ΔC_T dengan GAPDH sebagai *housekeeping gene*. Setelah dilakukan analisa ekspresi gen diketahui bahwa pada inkubasi diacerein selama 24 jam mampu meningkatkan ekspresi gen TIMP-1 dengan peningkatan sebesar 5,87 kali dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan pada inkubasi selama 48 jam, diacerein mampu meningkatkan ekspresi gen TIMP-1 secara bermakna dengan peningkatan sebesar 1,53 kali jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pemberian Diacerein selama 48 jam tingkat ekspresi gen TIMP-1 lebih kecil jika dibandingkan dengan tingkat ekspresi gen setelah pemberian Diacerein selama 24 jam, hal ini mungkin disebabkan oleh semakin lama proses inkubasi Diacerein dapat menurunkan daya kerja Diacerein secara *in vitro*.

SIMPULAN

Terdapat peningkatan ekspresi gen TIMP-1 pada sel sinovial osteoarthritis grade IV setelah pemberian diacerein.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). The global burden of disease 2004 Up-date. WHO Press, Switzerland. 2004
2. Rosemont. Treatment of osteoarthritis of the knee. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Edisi ke-2; 2013.
3. Miller LE, II JF, Block JE. Quality of live in patients with knee osteoarthritis; a commentary on nonsurgical and surgical treatments. The Open Orthopaedics Journal. 2013; 7: 619-23.
4. Roman JA, Blas MD, Jimenez MD. NF κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, Review. Osteoarthritis Research Society International. Osteoarthritis and Cartilage. 2006;14:839-48.
5. Goldring SR, Goldring MB. Clinical Aspects: Pathology and pathophysiology of osteoarthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006;6(4):376-37.
6. Imbawan, EIGN, Putra, TR, dan Kambayana, G. Korelasi kadar matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) dengan derajat beratnya osteoarthritis lutut. Journal Penyakit Dalam. 2011;12(3):181-192.
7. Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smith JPM, Daemen MJAP. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? Circ Res. 2001; 89:281-90.
8. Nicolas PM, Tod C, Padoin, Petitjean O. Clinical pharmacokinetics of diacerein. Clinical Pharmacokinetic. 1998;35:348-9.
9. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to cell culture human cell culture protocols. Methods in Molecular Biology. 2012; 806(1):1-13.
10. Schlaermann P, Toelle B, Berger H, Schmidt SC, Glanemann M, Ordemann J. A novel human gastric primary cell culture system for modelling helicobacter pylori infection in vitro. Journal of Rheumatology. 2016;65:202-13.

11. Yu-Tsang L, Hung-Jen S, Jyh-Horng W, Haw-Chang L, Sheng-Mou H, Tai-Horng Y. Hyaluronic acid modulates gene expression of connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human fibroblast-like synovial cells from advanced-stage osteoarthritis in vitro. *Journal of orthopaedic research*. 2009;492-6.
12. Jeffries M.A, Donica M, Baker LW, Stevenson ME, Annan AC, Humprey MB, Sawalha AH. Genome-Wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritis cartilage. *Arthritis and Rheumatology*. 2014;66(10):2804-15.
13. Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ, *et al*. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;15:R5.