

DISERTASI

**PENGARUH MIKRO RNA *miR-1* DAN *miR-133a* TERHADAP
EKSPRESI HDAC4 DAN SRFBP1 DALAM PROSES INDUKSI
TRANSDIFERENSIASI SEL CD34+ DARAH PERIFER
MENJADI KARDIOMIOSIT MATUR**



ANDRIANTO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**PENGARUH MIKRO RNA *miR-1* DAN *miR-133a* TERHADAP
EKSPRESI HDAC4 DAN SRFBP1 DALAM PROSES INDUKSI
TRANSDIFERENSIASI SEL CD34+ DARAH PERIFER
MENJADI KARDIOMIOSIT MATUR**



ANDRIANTO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**PENGARUH MIKRO RNA *miR-1* DAN *miR-133a* TERHADAP
EKSPRESI HDAC4 DAN SRFBP1 DALAM PROSES INDUKSI
TRANSDIFERENSIASI SEL CD34+ DARAH PERIFER
MENJADI KARDIOMIOSIT MATUR**

ANDRIANTO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**PENGARUH MIKRO RNA *miR-1* DAN *miR-133a* TERHADAP
EKSPRESI HDAC4 DAN SRFBP1 DALAM PROSES INDUKSI
TRANSDIFERENSIASI SEL CD34+ DARAH PERIFER
MENJADI KARDIOMIOSIT MATUR**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Rabu
Tanggal : 15 Juli 2020
Pukul : 09.00 – 11.30 WIB**

Oleh:

**ANDRIANTO
011517017329**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH MIKRO RNA *miR-1* DAN *miR-133a* TERHADAP
EKSPRESI HDAC4 DAN SRFBP1 DALAM PROSES INDUKSI
TRANSDIFERENSIASI SEL CD34+ DARAH PERIFER
MENJADI KARDIOMIOSIT MATUR

TELAH DISETUJUI

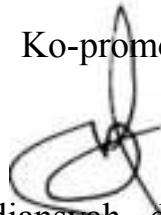
PADA TANGGAL 20 JULI 2020

Oleh
Promotor



Prof. Dr. Budi S. Pikir, dr.,Sp.PD.,Sp.JP(K)
NIP. 194908081977031002

Ko-promotor



Dr. Ferdiansyah, dr.,Sp.OT (K)
NIP. 196402121989111001

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)
pada Tanggal 15 Juli 2020**

Panitia penguji:

- Ketua : 1. Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh.
Anggota : 2. Prof. Dr. Budi S. Pikir dr., SpPD., SpJP (K)
3. Dr. Ferdiansyah, dr., Sp.OT (K)
4. Prof. Mohammad Yogiarto, dr., SpJP (K)
5. M. Saifur Rohman, dr., PhD., SpJP (K)
6. Dr. Budi Utomo, dr., M.kes
7. Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 238 / UN3.1.1/HK.04/2020
Tanggal : 15 Juli 2020

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmannirrahim,

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh,

Alhamdulillahirobbil'alaamiin segala puji bagi Allah SWT, Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan dan ajukan dalam Ujian Tahap I (Tertutup) Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Disertasi ini dapat saya selesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan dan koreksi dari promotor dan ko-promotor serta para penguji sejak ujian kualifikasi, ujian proposal, dan penilaian kelayakan disertasi. Oleh karena itu perkenankanlah dengan segala kerendahan dan ketulusan hati, saya menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Dr. Budi Susetyo Pikir, dr., Sp.PD., Sp.JP(K), selaku promotor, pembimbing akademik sekaligus guru/dosen yang penuh kesabaran dan perhatian, memberikan bimbingan, dukungan, dan meluangkan waktu untuk memberi bekal ilmu dan wawasan yang luas untuk saya menyelesaikan disertasi ini.

Dr. Ferdiansyah dr.,Sp.OT (K), selaku ko-promotor dan guru/dosen yang telah memberikan semangat dan dorongan serta kesempatan untuk terus belajar dan memberikan masukan untuk penyelesaian disertasi ini.

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. dan Prof. Moh. Yogiarto, dr., Sp.JP(K), FIHA sebagai guru/dosen dan penguji yang banyak memberikan semangat, motivasi, arahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran .

Dr. Gondo Mastutik, drh. M.Kes. dan Dr. H. Budi Utomo, dr. M.Kes sebagai penguji yang dengan teliti, sabar, bersemangat dan meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, masukan dan koreksi untuk penyelesaian dan perbaikan penulisan disertasi ini.

Mohammad Saifur Rohman, dr., Sp.JP(K), Ph.D, selaku penguji eksternal yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang berharga serta banyak membantu saya dalam penyelesaian penulisan disertasi ini.

Kepada para guru/dosen Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga : Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Prof. Dr. Zainuddin drs., Apt, Prof. Dr. Ketut Sudiana Drs., Msi., Prof. Indri Safitri, dr., MS. , Prof. Purnomo Suryohusodo, dr., SpBK, Siti Pariani, dr., MS., MSc., PhD., Dr. Sunarjo dr., MS, MSc., Dr. F. Sustini, dr., MS, Widodo JP, dr., MS, MPH, Dr. PH., dan Toetik Koesbardiati, Dra. Ph.D yang telah menambah wawasan keilmuan, memberikan bimbingan selama saya mengikuti pendidikan.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Nasih, SE., MT., Ak. yang telah memberi kesempatan saya mengikuti pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Sc., Sp.PD-K-EMD.,FINASIM selaku Mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan saya mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR, MSc, FINASIM selaku Ketua Program Studi dan Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., SpA(K), SpJP. selaku Mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam kelancaran proses pelaksanaan pendidikan selama ini.

Dr. Purwati, dr., Sp.PD-KPTI sebagai Ketua Penelitian dan Pengembangan *Stem Cell Centre* Universitas Airlangga, Dr.Heri Suroto, Sp.OT (K) sebagai Kepala Instalasi Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo dan Prof. Dr. Nasronuddin, dr., Sp.PD-KPTI sebagai Direktur RS Universitas Airlangga beserta seluruh staf atas izin penggunaan fasilitas laboratorium dan dukungan saat melakukan penelitian.

Direktur RSUD Dr. Soetomo Dr. Joni Wahyuhadi dr. Sp.BS (K) dan Mantan Direktur RSUD Dr. Soetomo, Dodo Anondo, dr. MPH dan H. Harsono,

dr., Ketua Departemen SMF Kardiologi dan Kedokteran Vaskular Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dr Agus Subagjo, Sp.JP(K), FIHA dan Muhammad Aminuddin, dr., Sp.JP(K) sebagai Mantan Ketua Departemen SMF yang telah memberikan izin dan kesempatan saya untuk mengikuti pendidikan.

Seluruh guru dan dosen sejak pendidikan dasar sampai dokter subspecialis yang telah memberi ilmu pengetahuan dan wawasan secara ikhlas, semoga Allah SWT meridhoinya.

Kepada subyek penelitian yang telah bersedia mengikuti penelitian ini. Anda adalah guru saya juga, dan saya menyampaikan terimakasih yang tak terhingga.

Kepada teman-teman seperjuangan di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya angkatan 2015/2016 yang saling memberi motivasi, mengingatkan dan memberi masukan yang dapat membantu penyelesaian disertasi ini. Tanpa mengurangi rasa penghargaan karena tidak dapat menyebutkan satu persatu, saya mengucapkan terimakasih atas segala keakraban dan kekompakan yang terjalin selama ini.

Dalam kesempatan yang berbahagia ini saya sampaikan ucapan terima kasih tak terhingga dan rasa hormat kepada kedua orang tua saya, ayahanda H. Damis Baedowi (almarhum) dan Ibunda Hj. Suyati Solikah yang telah mengasuh, membesarkan, mendidik saya dengan sabar, disiplin dan penuh kasih sayang. Kepada kedua mertua saya, ayahanda H. Ali Muchdor (almarhum) dan ibunda Hj. Endang Sri Utami atas bimbingan dan kasih sayang yang senantiasa diberikan. Kepada istri tercinta saya, Liantari Dyah Kartikasari drg., SpKGA yang dengan penuh kesabaran memberikan perhatian dan semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan saya. Kepada buah hati tercinta Syafira Yasmine, Shabrina Zulfi dan Satyatma Hakim yang selalu menjadi sumber inspirasi dan motivasi saya untuk menyelesaikan disertasi ini. Demikian pula kepada seluruh keluarga yang telah memberi dorongan dan semangat yang tiada hentinya selama saya mengikuti pendidikan.

Tidak lupa saya juga sampaikan terimakasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, atas segala bantuan dan motivasi hingga disertasi ini selesai.

Besar harapan saya semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan kedokteran khususnya ilmu kesehatan jantung dan pembuluh darah serta bermanfaat secara klinis untuk diterapkan pada pasien. Semoga Allah SWT selalu memberikan rahmat dan hidayahNya untuk kita semua. Aamiin.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Surabaya, Juli 2020

Penulis

RINGKASAN

Pengaruh Mikro RNA *miR-1* dan *miR-133a* terhadap Ekspresi HDAC4 dan SRFBP1 dalam Proses Induksi Transdiferensiasi Sel CD34+ Darah Perifer menjadi Kardiomyosit Matur

Penyakit jantung koroner dapat menyebabkan infark miokard yang ditandai dengan kematian kardiomyosit. Hingga saat ini, tujuan penanganan infark miokard terbatas pada mengembalikan aliran darah koroner dan mengurangi beban pada otot jantung. Namun, penanganan ini tidak dapat menggantikan kardiomyosit yang telah mati. Infark miokard juga merupakan penyebab utama dari gagal jantung. Sampai saat ini, belum ada terapi untuk gagal jantung lanjut kecuali transplantasi jantung, yang masih memiliki banyak keterbatasan seperti jumlah donor yang sedikit dan kemungkinan adanya rejeksi imunitas (Burchfield & Dimmeler, 2008; Dimmeler *et al.*, 2005). Terapi inovatif diperlukan untuk mengatasi masalah ini, salah satunya adalah melalui terapi regeneratif. Regenerasi miokardium yang telah mati dapat dilakukan dengan mengganti kardiomyosit yang telah mati dengan sel-sel baru yang berasal dari sel punca menggunakan teknik yang disebut dengan kardiomyoplasti seluler (Hanson *et al.*, 2012; Srivastava, 2017). Kardiomyoplasti seluler bertujuan untuk mengganti jaringan miokard yang rusak dan mengembalikan fungsi miokard (Chachques *et al.*, 2005; Hamano *et al.*, 2001).

Pemrograman ulang sel memiliki potensi untuk memperoleh ketersediaan sel melalui teknik induksi sel punca pluripoten dan transdiferensiasi (Takahashi & Yamanaka, 2006). Transdiferensiasi merupakan konversi jenis sel terdiferensiasi tertentu menjadi sel yang lain. Transdiferensiasi telah terbukti lebih aman dan memiliki proses yang relatif lebih sederhana dibandingkan dengan teknik induksi sel punca pluripoten (Wang *et al.*, 2015). Keberhasilan proses transdiferensiasi ditentukan oleh jenis sel sumber. Sel punca hematopoietik dengan penanda permukaan CD34+ berpotensi menjadi sumber sel karena sel ini dapat berdiferensiasi menjadi kardiomyosit. Proses diferensiasi ini dapat terjadi karena sel CD34+ berasal dari lapisan embrionik yang sama dengan jantung pada saat proses organogenesis yaitu lapisan mesoderm (Lim *et al.*, 2013). Selain itu, sel CD34+ dapat diambil dari darah perifer melalui prosedur minimal invasif (Romagnani *et al.*, 2006).

Transdiferensiasi sel dapat diinduksi oleh *microRNA* (*miRNA*). *MicroRNA* merupakan RNA *non coding* (bukan penyandi) yang bekerja pada tahap pasca transkripsi dengan mendegradasi atau menghambat translasi *messenger RNA* (*mRNA*) sasaran yang berakibat modifikasi ekspresi gen (Serradifalco *et al.*, 2013). Transdiferensiasi menggunakan *miRNA* lebih mudah dilakukan pada sel matur dan tidak memiliki risiko perubahan genom yang permanen. *MicroRNA* memiliki peran penting dalam tahap diferensiasi kardiomyosit, terutama *microRNA-1* (*miR-1*) dan *microRNA-133a* (*miR-133a*). *MicroRNA-1* diketahui memiliki jumlah paling dominan dalam jaringan jantung hingga 45%, sedangkan *miR-133a* adalah *miRNA* yang berasal dari kluster yang sama dengan *miR-1* dan memiliki aktivitas yang saling berhubungan (Malizia & Wang, 2011; Wang *et al.*, 2015).

MicroRNA-1 diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat ekspresi gen *histone deacetylase 4* (HDAC4), yang kemudian dapat meningkatkan ekspresi gen *myocyte enhancer factor 2* (MEF2). Peningkatan MEF2 dapat memicu diferensiasi sel menjadi kardiomyosit matur yang ditandai dengan peningkatan ekspresi *cardiac troponin (c-troponin)* (Al-Maqtari *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2015). *MicroRNA-133a* dapat menghambat gen *serum response factor binding protein 1* (SRFBP1) yang merupakan kofaktor dari gen *serum response factor* (SRF) (Sepulveda *et al.*, 2002). Penghambatan SRFBP1 dan SRF dalam sel akan memicu proliferasi dan menghambat diferensiasi sel menjadi kardiomyosit matur (Al-Maqtari *et al.*, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek transfeksi *miR-1* dan *miR-133a* terhadap ekspresi HDAC4 dan SRFBP1 dalam proses induksi transdiferensiasi sel CD34+ darah tepi menjadi kardiomyosit matur yang ditunjukkan dengan ekspresi *c-troponin*.

Sel CD34+ yang diisolasi dari darah tepi berhasil diisolasi menggunakan metode *magnetic beads*. Sel CD34+ darah perifer hasil isolasi kemudian diekspansi. Hasil ekspansi sel CD34+ telah aderen dan mencapai konfluensi 75% pada hari ke-7 sehingga proses transfeksi *miR-1* dan *miR-133a* dapat dilakukan. Sel CD34+ ditransfeksi menggunakan *miR-1* (kelompok P1) dan *miR-133a* (kelompok P2). Sel CD34+ juga diberikan medium diferensiasi kardiomyosit pada kelompok P3. Sel dipanen pada hari kedua pasca transfeksi untuk mengukur ekspresi gen HDAC4 dan SRFBP1 menggunakan RT-qPCR. Kultur sel CD34+ lain dipanen pada hari ke-5 pasca transfeksi untuk mengukur ekspresi *c-troponin* menggunakan metode imunositokimia.

Hasil pengukuran ekspresi gen menggunakan RT-qPCR menunjukkan bahwa transfeksi *miR-1* dapat menurunkan ekspresi gen HDAC4 -0,54 kali sedangkan transfeksi *miR-133a* dapat menurunkan ekspresi gen SRFBP1 sebesar -0,55 kali pada hari kedua pasca transfeksi. Pemberian medium diferensiasi kardiomyosit menurunkan ekspresi gen HDAC4 sebesar 0,60 kali dan meningkatkan ekspresi gen SRFBP1 sebesar 5,17 kali pada hari kedua pasca transfeksi. Pengukuran ekspresi *cardiac troponin* pada hari ke-5 pasca transfeksi menunjukkan prosentase dengan median 31,34 pada kelompok transfeksi *miR-1* (P1) dan pada kelompok dengan pemberian medium diferensiasi kardiomyosit (P3) menunjukkan prosentase dengan median 21,06. Hasil ini menunjukkan peningkatan prosentase *cardiac troponin* yang signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan P0 (median 12,13). Prosentase *cardiac troponin* pasca transfeksi *miR-133a* (P2) (median 7,15) tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan P0 (median 12,13) ($p > 0,05$). Efisiensi transdiferensiasi sel darah perifer CD34+ menjadi kardiomyosit matur setelah transfeksi *miR-1* adalah sebesar 32%, sedangkan setelah pemberian medium diferensiasi kardiomyosit adalah sebesar 21,4%.

Analisis regresi menunjukkan bahwa transfeksi *miR-1* memiliki hubungan positif yang signifikan dengan prosentase *cardiac troponin* ($B = 21,79$; $p = 0,001$). Analisis regresi juga menunjukkan bahwa transfeksi *miR-1* memiliki hubungan negatif yang signifikan dengan ekspresi gen HDAC4 ($B = -1,54$; $p = 0,001$). Transfeksi *miR-133a* tidak menunjukkan hubungan yang signifikan dengan prosentase *cardiac troponin* ($B = 5,65$; $p = 0,265$) tetapi memiliki hubungan negatif yang signifikan dengan ekspresi gen SRFBP1 ($B = -1,55$; $p = 0,001$). Pemberian medium diferensiasi kardiomyosit memiliki hubungan positif yang signifikan

dengan prosentase *cardiac troponin* ($B= 10,50$; $p= 0,001$), hubungan negatif yang signifikan dengan ekspresi gen HDAC4 ($B= -0,40$; $p=0,001$) dan juga hubungan positif yang signifikan dengan ekspresi gen SRFBP1 ($B= 4,17$; $p=0,001$). Ekspresi gen HDAC4 juga terbukti memiliki hubungan negatif dan signifikan dengan prosentase *cardiac troponin* ($B= -14,15$; $p=0,001$), sedangkan ekspresi gen SRFBP1 tidak berhubungan dengan prosentase *cardiac troponin* ($B = -3,64$; $p=0,265$).

Penelitian ini menyimpulkan bahwa transfeksi *miR-1* menurunkan ekspresi gen HDAC4, dan transfeksi *miR-133a* menurunkan ekspresi gen SRFBP1. Transfeksi *miR-1* lebih efektif dibandingkan dengan pemberian medium diferensiasi kardiomyosit dalam menginduksi transdiferensiasi sel CD34+ darah perifer menjadi kardiomyosit matur sedangkan transfeksi *miR-133a* tidak mempengaruhi proses induksi transdiferensiasi sel CD34+ darah perifer menjadi kardiomyosit matur. Ekspresi gen HDAC4 telah terbukti memiliki hubungan negatif dan signifikan dengan prosentase *cardiac troponin* sedangkan ekspresi gen SRFBP1 tidak memiliki hubungan terhadap prosentase *cardiac troponin*. Efisiensi transdiferensiasi sel darah tepi CD34+ menjadi kardiomyosit matur melalui transfeksi *miR-1* adalah 32% dan melalui pemberian medium diferensiasi kardiomyosit adalah 21,4%. Penelitian ini juga menunjukkan adanya temuan mekanisme baru bahwa *miR-1* dan medium diferensiasi kardiomyosit dapat menginduksi transdiferensiasi sel CD34+ darah perifer menjadi kardiomyosit matur melalui penurunan ekspresi gen HDAC4.

SUMMARY

The Effect of miR-1 and miR-133a on HDAC4 and SRFBP1 Expression in the Processes of Inducing Transdifferentiation of CD34+ Peripheral Blood Cells into Mature Cardiomyocytes

Coronary heart disease can cause myocardial infarction characterized by cardiomyocyte death. Until now, the aim of managing myocardial infarction is limited to restoring coronary blood flow and reducing the burden on the heart muscle. However, these treatments could not replace dead cardiomyocytes. Myocardial infarction is also a leading cause of heart failure. To date, there is no cure for advanced heart failure except heart transplantation, which still has many limitations, such as the small number of donors, and the possibility of immune rejection (Burchfield & Dimmeler, 2008; Dimmeler et al., 2005). Innovative therapy is needed to overcome these problems, one of which is through regenerative treatment. Regeneration of dead myocardium can be done by replacing dead cardiomyocytes with new cells originating from stem cells using a technique called cellular cardiomyoplasty (Hanson et al., 2012; Srivastava, 2017). Cellular cardiomyoplasty aims to replace damaged myocardial tissue and restore myocardial function (Chachques et al., 2005; Hamano et al., 2001).

Cellular reprogramming has the potential to obtain stem cell availability through pluripotent induction or transdifferentiation techniques (Takahashi & Yamanaka, 2006). Transdifferentiation is the technique of converting certain differentiated cell types into other cells. Transdifferentiation has been proven safer and has a more straightforward process than pluripotent induction (Wang et al., 2015). The success of the transdifferentiation process is determined by the source cell type. Hematopoietic stem cell marked CD34+ has the potential to become a source cell because these cells can differentiate into cardiomyocytes. This differentiation process can be done because CD34+ cells originate from the same embryonic layer as the heart called the mesoderm layer (Lim et al., 2013). Other than that, CD34 + cells can be extracted from large numbers of peripheral blood through minimally invasive procedures (Romagnani et al., 2006).

Cell transdifferentiation can be induced by microRNA (miRNA). MicroRNA is a non-coding RNA that works in the post-transcription stage by degrading or inhibiting the translation of messenger RNA (mRNA) that results in the modification of gene expression (Serradifalco et al., 2013). Transdifferentiation using miRNA is easier to do in mature cells and has no risk of permanent genome change. MicroRNA has a crucial role in the stage of differentiation of cardiomyocytes, especially microRNA-1 (miR-1) and microRNA-133a (miR-133a). miR-1 is known to have the most dominant amount in heart tissue up to 45%, while miR-133a is a miRNA derived from the same cluster as miR-1 whose functions and actions are interconnected (Malizia & Wang, 2011; Wang et al., 2015).

miR-1 is known to have the ability to inhibit the expression of the histone deacetylase 4 (HDAC4) gene, which then increases the expression of the myocyte enhancer factor 2 (MEF2) gene. Increasing MEF2 can trigger cell differentiation into mature cardiomyocytes characterized by the expression of cardiac troponin (Al-Maqtari et al., 2017; Chen et al., 2015). miR-133a can inhibit the Serum

Response Factor Binding Protein 1 (SRFBP1) gene, which is a cofactor of the serum response factor (SRF) gene (Sepulveda et al., 2002). Inhibition of SRFBP1 and SRF in cells will trigger proliferation and inhibit cell differentiation into mature cardiomyocytes (Al-Maqtari et al., 2017). This study aims to prove the effect of miR-1 and miR-133a on HDAC4 and SRFBP1 expression in the process of inducing transdifferentiation of CD34+ peripheral blood cells into mature cardiomyocytes, which is indicated by the expression of cardiac troponin.

CD34+ cells isolated from the peripheral blood was successfully done by magnetic bead isolation method. CD34+ cell culture was successfully expanded and was adherent and also confluent by 75% on the 7th day of culture. After the expansion, the CD34+ cell was transfected with miR-1 (P1) and miR-133a (P2). CD34+ cells also treated using cardiomyocyte differentiation medium (P3). Cells were harvested on the 2nd-day post-transfection to measure HDAC4 and SRFBP1 gene expression using RT-qPCR. The remaining cells are collected on the 5th-day post-transfection to measure the expression of cardiac troponin using immunocytochemistry.

Measurement results of gene expression using RT-qPCR showed that the transfection of miR-1 decreased HDAC4 gene expression by -0.54 fold while transfection of miR-133a decreased SRFBP1 gene expression by -0.55 fold at 2nd-day post-transfection. Treatment using cardiomyocyte differentiation medium decreased HDAC4 gene expression by 0.60 fold and increased SRFBP1 gene expression by 5.17 fold at 2nd-day post-transfection. Transfection of miR-1 (P1) (median 31.34) and treatment using cardiomyocyte differentiation medium (P3) (median 21.06) caused a significant increase in the percentage of cardiac troponin when compared to P0 (median 12.13) ($p < 0.05$) at 5th-day post-transfection. Transfection of miR-133a (P2) (median 7.15) did not change the percentage of cardiac troponin when compared to P0 (median 12.13) ($p > 0.05$). Transdifferentiation efficiency of CD34+ peripheral blood cells into mature cardiomyocytes through miR-1 transfection was 32%, while the treatment using the cardiomyocyte differentiation medium was 21.4%.

The regression analysis showed that miR-1 transfection had a significant positive relationship with the percentage of cardiac troponin ($B = 21.79$; $p = 0.001$). The analysis also showed that miR-1 transfection had a significant negative relationship with HDAC4 gene expression ($B = -1.54$; $p = 0.001$). The transfection of miR-133a showed no significant relationship to the percentage of cardiac troponin ($B = 5,65$; $p = 0.265$) but had a significant negative relationship with SRFBP1 gene expression ($B = -1.55$; $p = 0.001$). The addition of cardiomyocyte differentiation medium had a significant positive relationship with percentage cardiac troponin ($B = 10.50$; $p = 0.001$), a significant negative relationship with HDAC4 gene expression ($B = -0.40$; $p = 0.001$) and also a significant positive relationship with SRFBP1 gene expression ($B = 4.17$; $p = 0.001$). HDAC4 gene expression has been shown to had a negative and significant relationship with percentage of cardiac troponin ($B = -14.15$; $p = 0.001$) whereas SRFBP1 gene expression did not correlate with percentage of cardiac troponin ($B = -3.64$; $p = 0.265$).

This study concludes that miR-1 transfection reduced HDAC4 gene expression, and miR-133a transfection reduced SRFBP1 gene expression. Transfection of miR-1 more effective than the administration of cardiomyocyte

differentiation medium in the process of inducing transdifferentiation of peripheral blood CD34+ cells into mature cardiomyocytes. While miR-133a transfection did not influence the process of inducing transdifferentiation of peripheral blood CD34+ cells into mature cardiomyocytes. HDAC4 gene expression has been shown to had a negative and significant relationship with cardiac troponin expression whereas SRFBP1 gene expression had no relationship percentage of cardiac troponin. Transdifferentiation efficiency of CD34+ peripheral blood cells into mature cardiomyocytes through miR-1 transfection was 32% and through the addition of cardiomyocyte differentiation medium was 21.4%. This study also suggests a new mechanism of miR-1 and cardiomyocyte differentiation medium in the process of inducing transdifferentiation of peripheral blood CD34+ cells into mature cardiomyocytes by decreasing HDAC4 gene expression.