

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
HALAMAN AWAL DISERTASI	iii
HALAMAN PRASYARAT GELAR	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	xi
<i>SUMMARY</i>	xiv
ABSTRAK	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
DAFTAR ISI	xix
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR TABEL	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN	xxv
DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH	xxvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1. Manfaat Teoritis	6
1.4.2. Manfaat Praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Terapi Regeneratif	8
2.2. Proses Organogenesis Jantung	9
2.3. Kardiomioplasti Seluler pada Infark Miokard	11
2.4. Sel Punca (<i>Stem Cells</i>)	13
2.4.1. Sel Punca Dewasa	17
2.4.2. Sel Punca Hematopoetik CD34 ⁺ dari Darah Perifer sebagai Sumber IPSC	18
2.5. Pemrograman Ulang Sel (<i>Cellular Reprogramming</i>)	21
2.6. Mekanisme Epigenetik pada Komitmen Diferensiasi Sel	24
2.6.1. Metilasi DNA	25
2.6.2. Modifikasi Histon	28
2.6.3. <i>MicroRNA- induced silencing gene</i>	30
2.7. Pemrograman Ulang Langsung (Transdiferensiasi)	31
2.7.1. Transdiferensiasi dengan Transduksi Faktor Transkripsi	34
2.7.2. Transdiferensiasi dengan Molekul Kecil	36
2.7.3. Transdiferensiasi dengan <i>MicroRNA</i>	37

2.8.	<i>MicroRNA</i>	38
2.8.1.	Biogenesis <i>MicroRNA</i>	38
2.8.2.	<i>MicroRNA</i> Pada Perkembangan Sel Punca	41
2.9.	<i>MicroRNA</i> pada Diferensiasi Kardiomyosit	43
2.9.1.	<i>MicroRNA-1 (miR-1)</i>	43
2.9.1.1.	Peran <i>miR-1</i> dalam Pengendalian Diferensiasi Sel Punca Embriyonik menjadi Prekursor Mesodermal	45
2.9.1.2.	<i>MicroRNA-1</i> Mengendalikan Diferensiasi Prekursor Mesodermal menjadi Kardiomyosit	47
2.9.1.3.	Hubungan <i>miR-1</i> dengan Ekspresi Gen <i>Histone Diacetylase 4 (HDAC4)</i> dan <i>Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C)</i> Kardiomyosit	48
2.9.1.4.	<i>MicroRNA-1</i> pada Pemrograman Ulang Jenis Sel Lain menjadi Kardiomyosit	49
2.9.2.	<i>MicroRNA-133a (miR-133a)</i>	49
2.9.2.1.	Peran <i>miR-133a</i> dalam Kardiogenesis	50
2.9.2.2.	Hubungan <i>miR-133a</i> dengan Ekspresi Gen Faktor Transkripsi <i>Serum Response Factor (SRF)</i> dan Ko-faktor <i>SRF Binding Factor 1 (SRFBP1)</i>	52
2.9.2.3.	<i>MicroRNA-133a (miR-133a)</i> dalam Pemrograman Ulang Spesifik Kardiomyosit	56
2.10	Efisiensi Transdiferensiasi	56
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN		58
3.1.	Kerangka Konseptual	58
3.2.	Penjelasan Kerangka Konseptual	59
3.3.	Hipotesis	61
BAB 4 METODE PENELITIAN		62
4.1.	Rancangan Penelitian	62
4.2.	Waktu dan Tempat Penelitian	63
4.3.	Sampel Penelitian	63
4.4.	Besar Replikasi	64
4.5.	Variabel Penelitian	64
4.5.1.	Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>)	64
4.5.2.	Variabel Perantara	64
4.5.3.	Variabel Tergantung (<i>Dependent Variable</i>)	64
4.6.	Definisi Operasional	65
4.7.	Intstrumen dan Bahan Penelitian	68
4.7.1.	Instrumen Penelitian	68
4.7.2.	Bahan Penelitian	68

4.8.	Prosedur Penelitian	69
4.8.1.	Koleksi Sampel	69
4.8.2.	<i>Pre-Enrichment</i> , Isolasi, dan Ekspansi Sel Progenitor CD34 ⁺	69
4.8.2.1.	<i>Pre-enrichment</i> Sel Progenitor CD34 ⁺ dari Isolasi PBMC	69
4.8.2.2.	Isolasi Sel Progenitor CD34 ⁺ Metode <i>Magnetic Beads</i>	69
4.8.2.3.	Ekspansi Sel Progenitor CD34 ⁺	70
4.8.3.	<i>Delivery miRNA</i> pada Sel Progenitor CD34 ⁺ dengan Metode Transfeksi	71
4.8.3.1.	<i>Cell plating</i>	71
4.8.3.2.	Transfeksi <i>miRNA</i>	71
4.8.4.	Pemberian Medium Diferensiasi Kardiomyosit	72
4.8.5.	Pengukuran Perubahan Intraseluler	72
4.8.5.1.	Isolasi Total RNA	72
4.8.5.2.	RT-qPCR HDAC4 dan SRFBP1	73
4.8.6.	Identifikasi Penanda Kardiomyosit <i>Cardiac Troponin</i>	75
4.8.7.	Evaluasi Efisiensi Proses Transdiferensiasi	76
4.9.	Pengumpulan, Pengolahan, dan Analisis Data	76
4.9.1.	Pengumpulan Data	76
4.9.2.	Pengolahan Data	76
4.9.3.	Analisis Data	76
4.10.	Kelaikan Etik	77
4.11.	Alur Pelaksanaan Penelitian	78
BAB 5 HASIL PENELITIAN		79
5.1.	Isolasi Dan Kultur Sel CD34 ⁺ Darah Perifer	79
5.2.	Identifikasi Hasil Isolasi Sel CD34 ⁺ Darah Perifer	80
5.3.	Kultur dan Transfeksi Sel CD34 ⁺ Darah Perifer	81
5.4.	Validasi pemeriksaan RT-qPCR sel CD34 ⁺ Darah Perifer	84
5.4.1.	Validasi Pemeriksaan RT-qPCR Gen HDAC4	85
5.4.2.	Validasi Pemeriksaan RT-qPCR Gen SRFBP1	86
5.4.3.	Validasi Pemeriksaan RT-qPCR Gen β -actin	87
5.5.	Hasil Pemeriksaan RT-qPCR Gen β -actin Sel CD34 ⁺	88
5.6.	Hasil Pemeriksaan RT-qPCR Gen HDAC4 Sel CD34 ⁺	88
5.7.	Hasil Pemeriksaan RT-qPCR Gen SRFBP1 Sel CD34 ⁺	89
5.8.	Hasil Analisis Ekspresi <i>Cardiac Troponin</i>	91
5.9.	Efisiensi Transdiferensiasi Sel CD34 ⁺ menjadi Kardiomyosit Matur	94
5.10.	Mekanisme Jalur Pengaruh Transfeksi <i>miR-1</i> dan <i>miR-133a</i> dalam Proses Induksi Transdiferensiasi Sel CD34 ⁺ Darah Perifer menjadi Kardiomyosit Matur	94
BAB 6 PEMBAHASAN		97
6.1.	Isolasi Sel CD34 ⁺ Darah Perifer	97
6.2.	Proses Transfeksi <i>miR-1</i> dan <i>miR-133a</i> pada Sel CD34 ⁺	98

6.3.	Pengaruh Transfeksi miR-1 terhadap Ekspresi Gen HDAC4	100
6.4.	Pengaruh Transfeksi miR-133a terhadap Ekspresi Gen SRFBP1	102
6.5.	Perbedaan Pengaruh Transfeksi mirR-1, miR-133a dan Medium Diferensiasi Kardiomyosit dalam Induksi Transdiferensiasi Sel CD34+ menjadi Kardiomyosit Matur	104
6.6.	Pengaruh Transfeksi miR-133a terhadap Transdiferensiasi menjadi Kardiomyosit Matur	106
6.6.1	Hubungan Ekspresi Gen HDAC4 dengan Ekspresi <i>Cardiac Troponin</i>	106
6.6.2	Hubungan Ekspresi Gen SRFBP1 dengan Ekspresi <i>Cardiac Troponin</i>	109
6.7.	Efisiensi Transdiferensiasi Sel CD34+ menjadi Kardiomyosit Matur	112
6.8.	Temuan Baru dalam Penelitian	114
6.9.	Keterbatasan Penelitian	115
BAB 7 PENUTUP		117
7.1.	Kesimpulan	117
7.2.	Saran	118
DAFTAR PUSTAKA		119
LAMPIRAN-LAMPIRAN		130

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Klasifikasi Sel Punca Berdasarkan Potensi Diferensiasinya	11
2.2. Tahapan Diferensiasi <i>Stem Cell</i> menjadi Kardiomyosit dan Ekspresi Gen yang Dihasilkan	15
2.3. Lanskap Epigenetik Waddington	22
2.4. Sejarah Perkembangan iPSC	24
2.5. Skema Proses Metilasi dan Demetilasi serta Peran Enzim DNA Methyltransferase (DNMTs) dan TETs	27
2.6. Berbagai Proses Modifikasi Permukaan Nukleosom	29
2.7. Perbedaan antara Pemrograman Ulang dan Transdiferensiasi	32
2.8. Teknik Transdiferensiasi Secara <i>In Vitro</i> dan <i>In Vivo</i>	33
2.9. Biogenesis <i>miRNA</i>	40
2.10. Ekspresi Spesifik <i>Cluster miR-1</i> dan <i>miR-133</i>	55
3.1. Kerangka Konseptual	58
4.1. Desain Penelitian	62
4.2. Alur Pelaksanaan Penelitian	78
5.1. (A) Hasil Sentrifugasi Menggunakan Metode Gradien Ficoll (B) Isolasi sel CD34+ dengan <i>EasySep Magnet</i> (C) Proses <i>Seeding</i> Sel CD34+ pada <i>Well</i>	79
5.2. Karakterisasi Sel CD34+	81
5.3. Kultur sel CD 34+ Darah Tepi pada Hari ke-0 dan Hari Ke-1 dengan Perbesaran Mikroskopik 100x	82
5.4. Kultur Sel CD34+ (P0, P1, P2 dan P3) 2 Hari Pasca Transfeksi <i>miRNA</i>	83
5.5. Kultur Sel CD34+ (P0, P1, P2 dan P3) 5 Hari Pasca Transfeksi <i>miRNA</i>	84
5.6. (A) <i>Amplification Curve</i> Gen HDAC4 (B) <i>Melt Curve</i> Gen HDAC4	85
5.7. (A) <i>Amplification Curve</i> Gen SRFBP1 (B) <i>Melt Curve</i> Gen SRFBP1	86
5.8. (A) <i>Amplification Curve</i> Gen β -actin (B) <i>Melt Curve</i> Gen β -actin	87
5.9. Ekspresi Relatif Gen HDAC4	89
5.10. Ekspresi Relatif Gen SRFBP1	90
5.11. Sel dengan Ekspresi <i>Cardiac Troponin</i> Positif pada Kultur Sel Kelompok P0, P1, P2, dan P3	92
5.12. Grafik Nilai Median Jumlah Sel <i>Cardiac Troponin</i> Positif Masing-Masing Perlakuan	93
6.1. Mekanisme Jalur <i>miR-1</i> , <i>miR-133a</i> dan Medium Diferensiasi Kardiomyosit dalam Proses Induksi Transdiferensiasi Sel CD34+ Darah Perifer menjadi Kardiomyosit Matur	115

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Definisi Operasional	65
5.1. Nilai Ct Gen β -actin	88
5.2. Nilai Ct Gen HDAC4	88
5.3. Nilai Ekspresi Relatif Gen HDAC4	89
5.4. Nilai Ct Gen SRFBP1	90
5.5. Nilai Ekspresi Relatif Gen SRFBP1	90
5.6. Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i> Jumlah Sel <i>Cardiac Troponin</i> Positif	93
5.7. Efisiensi Hasil Transdiferensiasi Sel CD34+ menjadi Kardiomyosit Matur	94
5.8. Hasil Analisis Regresi Hubungan <i>miR-1</i> , <i>miR-133a</i> , dan Medium Diferensiasi Kardiomyosit terhadap HDAC4, SRFBP1 dan <i>Cardiac Troponin</i>	95

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Sertifikat Kelaikan Etik	130
2. <i>Informed Consent</i> (Persetujuan setelah Penjelasan)	131
3. <i>Informed Consent</i> (Persetujuan Mengikuti Penelitian)	139
4. Pernyataan Peneliti	140
5. Perhitungan <i>Comparative Ct</i>	141
6. Analisis Statistik	143

DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN DAN ISTILAH

α	: alfa
α -MHC	: <i>alfa – myosin heavy chain</i>
bFGF	: <i>basic fibroblast growth factor</i>
BM-MSC	: <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>
BMPs	: <i>bone morphogenic protein</i>
BMP4	: <i>bone morphogenic protein 4</i>
BRG1	: <i>brahma – related gene 1</i>
c-Myc	: <i>cellular Myc</i>
CAMKII	: <i>Ca²⁺/calmodulin – dependent protein kinase II</i>
CABG	: <i>coronary artery bypass grafting</i>
CD34 ⁺	: <i>cluster differentiation 34 positive</i>
CDK9	: <i>cyclin dependent kinase 9</i>
cTnT	: <i>cardiac troponin</i>
DGCR8	: <i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DKK1	: <i>Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor</i>
DNA	: <i>deoxyribo nucleic acid</i>
DLL-1	: <i>notch ligand delta like 1</i>
EB	: <i>embryoid body</i>
ECM	: <i>extracellular matrix</i>
EGFR	: <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPC	: <i>endothelial progenitor cell</i>
ESC	: <i>embryonic stem cell</i>
FCS	: <i>fetal calf serum</i>
FGFs	: <i>fibroblast growth factors</i>
Flk1	: <i>fetal liver kinase 1</i>
FOXC1	: <i>forkhead box C1</i>
FRS2	: <i>fibroblast growth receptor substrat 2</i>
G-CSF	: <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GATA4	: <i>Gata binding protein 4</i>
GATA6	: <i>Gata binding protein 6</i>
GFP	: <i>green fluorosence protein</i>
HAND1	: <i>heart and neural crest derivates 1 expressed</i>
HAND2	: <i>heart and neural crest derivates 2 expressed</i>
HCN4	: <i>potassium activated cyclic nucleotide gated channel 4</i>
HDAC4	: <i>histone deacetylase 4</i>
hESC	: <i>human embryonic stem cells</i>
HES1	: <i>hairy and enhancer of split 1</i>
HNF4	: <i>hepatocyte nuclear factor 4</i>
HOPX	: <i>homeodomain – only protein</i>
HPCs	: <i>human pluripotent stem cells</i>
HSC	: <i>haematopoetic stem cells</i>
iPSC	: <i>induced pluripotent stem cells</i>
Isl1	: <i>islet-1</i>
KDR	: <i>kinase insert domain protein receptor</i>
KHSRP	: <i>KH type splicing regulatory protein</i>
KLF1	: <i>kruppel like factor 1</i>

KLF4	: <i>kruppel like factor 4</i>
LIF	: <i>leukemia inhibitory factor</i>
MBNL1	: <i>muscleblind like 1</i>
MCD	: <i>multipotent cardiovascular precursor</i>
MCFs	: <i>mouse cardiac fibroblasts</i>
MEFs	: <i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MEF2	: <i>myocyte enhancer factor 2</i>
MEF2C	: <i>myocyte enhancer factor 2C</i>
MESP1	: <i>mesoderm posterior protein 1</i>
MHC	: <i>myosin heavy chain</i>
MIB1	: <i>E3 ubiquitin – protein ligase</i>
miRNA	: <i>micro ribonucleic acid</i>
miR-1	: <i>micro ribonucleic acid 1</i>
miR-3	: <i>micro ribonucleic acid 3</i>
miR-133	: <i>micro ribonucleic acid 133</i>
miR-133a	: <i>micro ribonucleic acid 133a</i>
miR-206	: <i>micro ribonucleic acid 206</i>
miR-208	: <i>micro ribonucleic acid 208</i>
miR-499	: <i>micro ribonucleic acid 499</i>
MLC2	: <i>myosin light chain 2</i>
MLC-2a	: <i>atrial myosin regulatory light chain 2</i>
MLC-2v	: <i>ventricular myosin regulatory light chain 2</i>
mRNA	: <i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	: <i>mammalian target of rapamycin</i>
MSC	: <i>mesenchymal stem cell</i>
MyoCD	: <i>myocardin</i>
MyoD	: <i>myogenic differentiation</i>
MYT1	: <i>myelin transcription factor 1</i>
NEUROD4	: <i>neuronal differentiation 4</i>
NKX2.5	: <i>NK2 homeobox 5</i>
OCT4	: <i>octamer – binding transcription factor 4</i>
PACT	: <i>p53 associated cellular protein transcription factor</i>
PCI	: <i>percutaneous coronary intervention</i>
POU5F1	: <i>POU domain class 5 transcription factor 1</i>
PHOX2B	: <i>paired like homeobox 2B</i>
PP2A	: <i>protein fosfatase 2A</i>
RT-PCR	: <i>real time polymerase chain reaction</i>
Ran-GTP	: <i>GTP binding RAs – related nuclear protein</i>
RISC	: <i>RNA induced silencing complex</i>
RXRA	: <i>retinoid X receptor alpha</i>
SM- α actin	: <i>smooth muscle α actin</i>
SMAD3	: <i>mothers against decapentaplegic (DPP) homolog 3</i>
SMARCD3	: <i>SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily D member 3</i>
SMARCA4	: <i>SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A member 4</i>
SNAIL	: <i>snail family transcriptional repressor 1</i>
SOX2	: <i>SRY related HMG-box 2</i>

SRE	: <i>serum response element</i>
SRF	: <i>serum response factor</i>
SRFBP	: <i>serum response factor binding protein</i>
SRFBP1	: <i>serum response factor binding protein 1</i>
SSEA-3	: <i>stage specific embryonic antigen 3</i>
SSEA-4	: <i>stage specific embryonic antigen 4</i>
STRAP	: <i>SRF dependent transcription regulation-associated protein</i>
TBX3	: <i>T box 3</i>
TBX5	: <i>T box 5</i>
TBX5/20	: <i>T box 5-20</i>
TDP-43	: <i>TAR DNA – binding protein 43</i>
TRA	: <i>T cell receptor alpha</i>
TRBP	: <i>transactivation response element RNA binding protein</i>
TTFs	: <i>tail tip fibroblasts</i>
VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>
Wnt	: <i>wingless int-1</i>
XPO5	: <i>exportin 5</i>
3'UTR	: <i>untranslated regions</i>