

TESIS

**HUBUNGAN ANTARA MUTASI GEN TP53 DENGAN DERAJAT
DIFERENSIASI HISTOPATOLOGIS PADA PENDERITA
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA DI RSUD DR. SOETOMO**



Oleh:

Astari Puteri
NIM 011814153018

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**HUBUNGAN ANTARA MUTASI GEN TP53 DENGAN DERAJAT
DIFERENSIASI HISTOPATOLOGIS PADA PENDERITA
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA DI RSUD DR. SOETOMO**

Oleh:

**Astari Puteri
NIM 011814153018**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

PRASYARAT GELAR

**HUBUNGAN ANTARA MUTASI GEN TP53 DENGAN DERAJAT
DIFERENSIASI HISTOPATOLOGIS PADA PENDERITA
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA DI RSUD DR. SOETOMO**

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister Sains
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

Astari Puteri
NIM 011814153018

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISAHKAN
PADA TANGGAL 16 MEI 2022

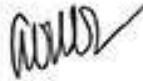
Oleh

Pembimbing Utama



Prof. Retno Handajani, dr., MS. PhD.
NIDK 194810122019026201

Pembimbing Kedua



Dr. Gwenny Ichsan Prabowo, dr., M.Kes.
NIP 196209291990022003

Mengetahui,
Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si
NIP 197009151998022001

LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada
Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Jenjang Magister
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
pada tanggal 9 Mei 2022

Panitia Penguji

- Ketua Penguji : 1. Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD
- Anggota Penguji : 2. Prof. Retno Handajani, dr, M.S, Ph.D
3. Dr. Gwenny I. P., dr., M.Kes.
4. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, drs.,M.Si
5. Dr. Hari Basuki Notobroto dr., M.Kes.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Tesis

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Astari Puteri

NIM : 011814153018

Program Studi : Magister Ilmu Kedokteran Dasar

Judul Tesis : HUBUNGAN ANTARA MUTASI GEN TP53 DENGAN
DERAJAT DIFERENSIASI HISTOPATOLOGIS PADA PENDERITA
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA DI RSUD DR. SOETOMO

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil karya peniruan atau penjiplakan (plagiarism) dari karya orang lain, tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan di dalam daftar pustaka. Demikian pernyataan ini dibuat tanpa ada paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 13 Mei 2022

A red and yellow official stamp from Universitas Airlangga is visible. The stamp contains the text "METERAI TEMPEL" and a unique identification number "BD413AJX774966597". A handwritten signature in black ink is written over the stamp.

Astari Puteri
011814153018

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur senantiasa saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis berjudul **“HUBUNGAN ANTARA MUTASI GEN TP53 DENGAN DERAJAT DIFERENSIASI HISTOPATOLOGIS PADA PENDERITA *ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA* DI RSUD DR. SOETOMO”**.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Retno Handajani, dr, M.S, Ph.D selaku pembimbing utama, atas peran dan jasanya meluangkan waktu, membimbing serta memberikan saran, yang dengan sabar mengajar dan memberikan pemahaman dan motivasi dalam penyusunan tesis ini. Terimakasih yang sebesar-besarnya juga kami ucapkan kepada Dr. Gwenny I. P., dr., M.Kes. selaku pembimbing kedua serta atas perannya mengajari, menjelaskan, memberikan bimbingan dengan sabar, memberikan banyak koreksi kepada saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Banyak pihak yang juga berperan dalam penyusunan tesis ini, oleh karena itu, saya menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., CMA, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menjalani pendidikan di Universitas Airlangga.
2. Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Airlangga saat

- ini, Dr. Arifa Mustika dr., M.Si dan koordinator periode 2015-2020, Prof. Dr.Kuntaman dr., MS., SpMK (K) beserta jajarannya, atas kesempatan dan kemudahan yang diberikan dalam pelayanan akademik selama pendidikan.
3. Ketua Peminatan Biokimia saat ini, Dr. Ema Qurnianingsih dr. M.Si, dan Ketua Peminatan periode 2015-2020, Prof. Dr. Harianto Notopuro dr., MS yang senantiasa mengarahkan dan membimbing selama pendidikan kami.
 4. Dosen penguji seminar proposal saya Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD , Prof. Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.Si, dan Dr. Hari Basuki Notobroto dr., M.Kes. yang memberikan banyak masukan untuk memperbaiki penulisan proposal penelitian dan tesis saya.
 5. Dosen pembimbing klinis saya di Staf Medis Fungsional (SMF) Bedah RSUD Dr. Soetomo yaitu Dr. R. Marjono Dwi Wibowo dr., Sp.B(K)KL. dan di GDC PA RSUD Dr. Soetomo yaitu Dr. Willy Sandhika dr., M.Si., Sp.PA(K).
 6. Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya yang telah memberikan persetujuan etik dan memperkenankan pengambilan sampel dan data pasien untuk penelitian ini.
 7. Dosen-dosen Departemen Ilmu Faal dan Biokmia Kedokteran dan IKD yang senantiasa memberikan ilmunya selama pendidikan kami.
 8. Dr. Citrawati Dyah Kencono Wungu, dr., M.Si. yang senantiasa memberikan saran, mengajari saya, serta memotivasi saya pada saat prajab ASN dan penelitian di ITD.
 9. Mochamad Amin, S.Si., MSi dan Yanna Debby Restifanny Yasan, S.Si yang turut membimbing dan membantu pelaksanaan penelitian di Laboratorium Hepatitis ITD. Widhi A.Md. yang membantu mencari *slide* HE dan blok

parafin di GDC PA. Devi Putri Irnawati A.Md. AM. dan Umriyatul Azizah, A.Md .yang membantu pembuatan dan pengecatan preparat di Laboratorium PA FK.

10. Orang tua tercinta, Mundi Santoso, drg. dan Prof. Dr. Asti Meizarini, drg, M.S., serta kakak tercinta Tania Astiti, drg., M. Kes dan keluarga besar penulis atas doa dan bantuan materiil dan moril sehingga penyusunan tesis ini bisa berjalan dengan lancar.
11. Sahabat IKD angkatan 2018 pada peminatan biokimia yaitu Choirotussanijjah, dr., M.Si. dan I Nyoman Bagus Aji Kresnapati, S.Si., M.Si. yang senantiasa memberikan masukan dan ide dalam penyusunan tesis ini.
12. Ketua Bagian Patologi Mulut dan Maksilofasial Prof. Dr. A Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes, Sekretaris bagian Sisca Meida Wati, drg., M.Kes, PhD, dan dosen bagian patologi yang lain yang yang senantiasa mengajari dan memotivasi saya untuk menyelesaikan studi ini.
13. Adya Pramusita, drg., M.Si, sahabat terbaik saya yang selalu memotivasi, membagi protokol penelitiannya di Jepang, dan memberikan solusi ketika saya mendapatkan hasil yang kurang memuaskan.
14. Sahabat eks-Klinik Bantuan Penulisan Jurnal Internasional (KBPII) dan saat ini *publication center* dan dental jurnal, Dr. Alexander Patera Nugraha, drg., M.Imun, Nastiti Faradilla Ramadhani, drg., Alivy Aulia Az Zahra, drg., Sp.KGA, Saka Winias, drg., M.Kes, Sp.PM, dan M. Dimas Aditya Ari, drg., MKes, Sp.Pros. yang selalu memberikan motivasi.

15. Teman-teman Unit Perencanaan dan Pengembangan Fakultas (UPPF) FKG Universitas Airlangga, Dini Setyowati S.KG, MPH, Ph.D., Beta Novia Rizky, drg., M.Si., Aulia Ramadhani, drg., dan Lucindari Gea Permata, drg.

16. Serta pihak-pihak lain yang tidak bisa sebutkan satu persatu

Penulis menyadari masih banyak kekurangan yang ada dalam penyusunan tesis ini, sehingga mengharapkan kritik dan masukan dari semua pihak agar dapat diperbaiki di masa mendatang. Akhir kata, semoga penyusunan tesis ini dapat bermanfaat dan memberikan kebaikan bagi kita semua.

Surabaya, Mei 2021

Penulis

RINGKASAN

Oral squamous cell carcinoma (OSCC), merupakan keganasan yang terjadi secara spesifik pada daerah rongga mulut dengan insidensi sebanyak 377.000 kasus pada tahun 2020 di seluruh dunia (Sung *et al.*, 2021). Keganasan OSCC memiliki risiko kematian yang cukup tinggi dengan *5 years survival rate* kurang dari 50% dan secara umum, *survival rate* dari penderita OSCC tidak mengalami perubahan yang signifikan selama 30 tahun terakhir (Gaykalova *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2017). Saat ini penentuan prognosis dan rencana perawatan dari OSCC seringkali ditentukan melalui lokasi keganasan dan klasifikasi Tumor, Nodul limfe, Metastasis (*TNM stage*) (Lindemann *et al.*, 2018). Akan tetapi beberapa penelitian menunjukkan hasil perawatan OSCC yang tidak memuaskan, dengan lesi yang ditentukan berada di stadium awal ternyata memiliki respon perawatan dan perjalanan penyakit yang buruk (Lin *et al.*, 2020). Oleh karena itu, diperlukan *biomarker* dengan efektifitas yang lebih baik dalam memperkirakan prognosis dari OSCC (Zhou *et al.*, 2016).

Gen TP53 merupakan gen penyandi protein *tumor suppressor* p53 yang memiliki peran penting dalam menekan pembentukan tumor dan melindungi kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) melalui stimulasi *cell cycle arrest*, DNA *repair*, atau apoptosis (Júnior *et al.*, 2014; Hientz *et al.*, 2017). Mutasi pada gen TP53 menyebabkan gangguan pada kinerja protein p53 sebagai tumor suppressor (Wang *et al.*, 2017; Zonaruddin *et al.*, 2013), bahkan dapat menyebabkan *gain of function* (*GOF*) sebagai onkogen, sehingga memengaruhi tumorigenesis dan progresivitas dari kanker dan memberikan dampak secara klinis (Zhou *et al.*, 2016).

Penelitian terbaru menunjukkan potensi status mutasi TP53 pada ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 sebagai *marker* diagnosis genetik untuk menentukan prognosis, karena mutasi pada kedua kodon tersebut diketahui dapat meningkatkan progresivitas, *survival rate*, dan resistensi terhadap radiasi dan kemoterapi (Osman *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016; Lindemann *et al.*, 2018). Akan tetapi hingga saat ini dampak kedua mutasi tersebut terhadap derajat diferensiasi histopatologis OSCC di Indonesia belum pernah diteliti. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengestimasi prevalensi mutasi gen TP53 ekson 5 kodon 175 and ekson 7 kodon 245 serta membuktikan hubungan mutasi tersebut dengan ekspresi p53 dan derajat diferensiasi histopatologis pada penderita OSCC di RSUD Dr. Soetomo.

Penelitian ini dilakukan menggunakan sampel blok parafin yang didapatkan dari penderita OSCC RSUD Dr. Soetomo tahun 2014-2020. Sebanyak empat puluh empat blok parafin dilakukan pemotongan untuk pemeriksaan derajat diferensiasi histopatologis melalui pengecatan *hematoxylin eosin* (HE), ekspresi p53 menggunakan teknik imunohistokimia (IHK), dan mutasi pada gen TP53 ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 menggunakan metode *polymerase chain reaction* dilanjutkan dengan *Restriction fragment length polymorphism* (PCR RFLP) menggunakan enzim restriksi *HhaI* dan *AclI*. Hasil pemeriksaan kemudian ditabulasi dan dianalisis menggunakan uji beda *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan ekspresi p53 berdasarkan status mutasi gen TP53 ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245. Analisis lanjutan koefisien Eta dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara status mutasi dengan ekspresi p53. Untuk menganalisis hubungan antara kedua status mutasi dengan derajat diferensiasi histopatologis OSCC, digunakan analisis asosiasi *Cramer's V*. Koefisien korelasi *Spearman*

digunakan untuk mengetahui hubungan antara tingkat ekspresi p53 dengan derajat diferensiasi histopatologis OSCC.

Hasil pemeriksaan PCR-RFLP menunjukkan pada penderita di RSUD Dr. Soetomo tahun 2014-2020 terdapat prevalensi mutasi gen TP53 ekson 5 kodon 175 sebesar 43,2% (95% CI 28,3-59,0 %) dan 4,5% % (95% CI 0,6-15,5%) untuk mutasi gen TP53 ekson 7 kodon 245. Kejadian mutasi TP53 ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 menunjukkan ekspresi p53 yang lebih tinggi secara signifikan. Hubungan antara status mutasi pada gen TP53 ekson 5 kodon 175 dengan tingkat ekspresi p53 berkekuatan sedang, sedangkan hubungan antara status mutasi ekson 7 kodon 245 dengan tingkat ekspresi p53 berkekuatan lemah. Hasil analisis asosiasi *Cramer's V* menunjukkan hubungan antara status mutasi gen TP53 pada kedua ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 dengan derajat diferensiasi histopatologis OSCC sama-sama berkekuatan sedang yang signifikan. Hasil pemeriksaan korelasi *Spearman* menunjukkan hubungan positif berkekuatan sedang yang signifikan antara tingkat ekspresi p53 dengan derajat diferensiasi histopatologis OSCC.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah prevalensi mutasi gen TP53 ekson 5 kodon 175 sebesar 43,2% (95% CI 28,3-59,0 %) dan ekson 7 kodon 245 4,5% (95% CI 0,6-15,5%) pada penderita OSCC di RSUD Dr. Soetomo tahun 2014-2020. Pada kasus OSCC dengan kejadian mutasi pada kedua kodon tersebut masing-masing menunjukkan adanya jumlah ekspresi p53 yang lebih tinggi secara signifikan dan memiliki hubungan positif berkekuatan sedang yang signifikan dengan derajat diferensiasi histopatologis OSCC.

SUMMARY

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant tumor lesion in the oral cavity area with incidence of 377.000 global cases in 2020 (Sung et al., 2021).. Despite the advancing technology for the treatment and drug discovery in the cancer field, OSCC has kept its high death risk with less than 50% of five-year survival rate for the last three decades (Gaykalova et al., 2014; Chang et al., 2017). To date, the prognosis and the treatment plan of OSCC are often decided through its location and TNM staging system. However, several findings found some unsatisfactory results of OSCC treatment, with early-stage lesions may result in poor outcomes (Lindemann et al., 2018). Thus, a reliable biomarker with better effectivity is needed to decide the prognosis of OSCC (Lin et al., 2020).

The TP53 is a gene that codes p53 tumor suppressor protein, which plays a vital role in suppressing tumor formation and guarding the DNA damage through stimulating cell cycle arrest, DNA repair, or apoptosis (Júnior et al., 2014; Hientz et al., 2017). Mutation of this gene leads to losing its function as a tumor suppressor (Wang et al., 2017; Zamaruddin et al., 2013), and instead, it can result in gaining new function as an oncogene and increase the tumor progressivity clinically (Zhou et al., 2016). Recent findings show the potential of TP53 mutation in exon 5 codon 175 and exon 7 codon G245 to be a reliable genetic diagnostic for prognosis and prediction of therapeutic response, as both mutations are strongly linked to increasing progressivity, poor survival, and tumor resistance to radiation and chemotherapy (Osman et al., 2015; Zhou et al., 2016; Lindemann et al., 2018). However, the association of these mutations with the histopathological grading of the OSCC in Indonesia is still unknown. Thus, this study aimed to estimate the

prevalence of TP53 mutation exon 5 in both codon 175 and exon 7 codon 245 and to prove its association with p53 expression and histopathological grading outcome in OSCC patient in Dr Soetomo Hospital.

This study using the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples obtained from OSCC patients in Dr. Soetomo Hospital. Forty-four FFPE samples were sliced for several examination: hematoxylin-eosin (HE) staining for histopathological grading examination, immunohistochemistry (IHC) staining to observe p53 expression, and polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method using HhaI and AclI restriction enzymes to detect the TP53 mutation in exon 5 codon 175 and exon 7 codon G245. The recorded data were tabulated and analyzed using Mann Whitney continued with Eta Coefficient to see p53 expression difference based on the mutational status and its associations. Cramer's V association was used to analyze the association between mutational status for each codon and the histopathological grading. Spearman correlation was used to observe the correlation between p53 expression and the histopathological grading outcome.

The result of PCR-RFLP examination showed that prevalences of TP53 exon 5 codon 175 mutation was 43.2% (95% CI 28,3-59,0 %) and 4.5% (95% CI 0,6-15,5%) for TP53 exon 7 codon 245 mutation. Cases with TP53 mutation in exon 5 codon 175 and exon 7 codon G245 showed significantly higher p53 expression compared to those without any mutation. The continuation analysis, Eta coefficient, showed medium strength association between p53 expression with TP53 exon 5 codon 175 mutational status and weak association with TP53 exon 7 codon 245 mutational status. The Cramer's V association test showed medium strength

significant associations between the mutational status of TP53 on both codons 175 and 245 with the histopathological grading outcome in OSCC patients. Spearman correlation found positive medium strength correlation between p53 expression and histopathological grading outcome.

To be concluded, the prevalences of TP53 exon 5 codon 175 mutation was 43.2% (95% CI 28,3-59,0 %) and of exon 7 codon G245 was 4.5% (95% CI 0,6-15,5%) in OSCC patient in Dr. Soetomo Hospital during 2014-2020. In OSCC cases with mutation in both codons, there are a significant increase of p53 expression and showed medium strength significant associations with the histopathological grading outcome in OSCC patients.

ABSTRAK

Latar belakang: *Oral squamous cell carcinoma* (OSCC), merupakan keganasan yang terjadi secara spesifik pada daerah rongga mulut dengan *5 years survival rate* kurang dari 50% selama 30 tahun terakhir. Status mutasi TP53 pada ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 diketahui berpotensi sebagai *marker* diagnosis genetik untuk menentukan prognosis and prediktor respon terapi, akan tetapi hubungan dari kedua mutasi ini dengan derajat diferensiasi gambaran histopatologis pada penderita OSCC belum diketahui. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengestimasi prevalensi mutasi gen TP53 pada kedua kodon serta membuktikan hubungan mutasi tersebut dengan ekspresi p53 dan derajat diferensiasi gambaran histopatologis pada penderita OSCC di RSUD Dr. Soetomo. **Metode:** Sebanyak empat puluh empat sampel dilakukan pengecatan *hematoxylin eosin* (HE) untuk melihat derajat diferensiasi histopatologis dan pengecatan imunohistokimia (IHK) untuk melihat ekspresi p53. Deteksi mutasi pada gen TP53 ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 menggunakan metode *polymerase chain reaction* dilanjutkan dengan *Restriction fragment length polymorphism* (PCR RFLP) menggunakan enzim restriksi *HhaI* dan *AclI*. Data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji *Mann Whitney* dilanjutkan dengan analisis koefisien Eta, analisis koefisien asosiasi *Cramer's V* dan analisis korelasi *Spearman*. **Hasil:** Prevalensi mutasi TP53 ekson 5 kodon 175 sebesar 43.2% (95% CI 28,3-59,0 %) dan mutasi TP53 ekson 7 kodon 245 sebesar 4.5% (95% CI 0,6-15,5%). Terdapat perbedaan signifikan ekspresi p53 pada kelompok dengan mutasi ekson 5 kodon 175 ($p=0.001$) dan mutasi ekson 7 kodon 245 ($p=0.024$) bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak mengalami mutasi. Terdapat hubungan berkekuatan sedang yang signifikan terhadap derajat diferensiasi histopatologis OSCC pada kelompok dengan mutasi TP53 ekson 5 kodon 175 ($V=0.431$; $p=0.017$) dan ekson 7 kodon 245 ($V=0.409$; $p=0.025$). **Kesimpulan:** Terdapat hubungan berkekuatan sedang yang signifikan antara status mutasi TP53 ekson 5 kodon 175 dan ekson 7 kodon 245 dengan derajat diferensiasi histopatologis pada penderita OSCC.

Kata kunci: G245, *Oral Squamous Cell Carcinoma*, R175, RFLP, TP53

ABSTRACT

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant tumor lesion in the oral cavity area with less than 50% of five-year survival rate for decades. The TP53 mutation in exon 5 codon 175 and exon 7 codon 245 can be a reliable genetic diagnostic for prognosis and prediction of therapeutic response, however, the association of these mutations with the histopathological grading of the OSCC is still unknown. **Purpose:** This study aimed to estimate the prevalence of mutation in TP53 exon 5 codon 175 and exon 7 codon 245 and to prove its association between the mutations with p53 expression and histopathological grading outcome in OSCC patient. **Methods:** Forty-four FFPE samples were stained with haematoxylin eosin to observe its histopathological grade and underwent IHC examination to observe p53 expression. The mutation was tested through PCR-RFLP method using HhaI and AclI enzyme. Data recorded was analyzed using Mann Whitney continued with Eta coefficient, Cramer's V association, and Spearman correlation. **Results:** The prevalence of TP53 exon 5 codon 175 mutation was 43.2% (95% CI 28,3-59,0 %) and TP53 mutation in exon 7 codon 245 was 4.5% (95% CI 0,6-15,5%). There were significant different expressions of p53 in the codon 175-mutated ($p=0.001$) and codon 245-mutated ($p=0.024$) group compared to the non-mutated group. Medium strength significant associations were found between the histopathological grading result and the mutational status of both TP53 mutation in exon 5 codon 175 ($V=0.431$; $p=0.017$) and in exon 7 codon 245 ($V=0.409$; $p=0.025$). **Conclusion:** There were medium strength significant association between the mutational status of TP53 in both exon 5 codon 175 and exon 7 codon 245 with the histopathological grading outcome in OSCC patient.

Keywords: G245, Oral Squamous Cell Carcinoma, R175, RFLP, TP53

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN.....	i
SAMPUL DALAM.....	ii
LEMBAR PRASYARAT GELAR MAGISTER.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN	xi
<i>SUMMARY</i>	xiv
ABSTRAK	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
DAFTAR ISI.....	xix
DAFTAR TABEL.....	xxii
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis	7
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 8
2.1 <i>Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC)</i>	8
2.1.1 Epidemiologi OSCC	8
2.1.2 Faktor Risiko.....	9
2.1.3 Patogenesis.....	10
2.1.4 Perawatan OSCC.....	15
2.2 Gen dan Protein p53.....	16
2.2.1 Gen TP53	16
2.2.1.1 Struktur TP53.....	16
2.2.1.2 Mutasi TP53	17
2.2.1.3 Pengaruh Mutasi TP53 <i>Hotspot</i> Terhadap Progresivitas OSCC.....	20
2.2.2 Protein p53	22
2.2.2.1 Struktur p53.....	23

2.2.2.2 Fungsi p53	24
2.2.2.3 Peran p53 Pada Patogenesis OSCC.....	25
2.2.2.4 Mutasi p53.....	28
2.2.2.5 Pengaruh Mutasi TP53 Terhadap Patogenesis OSCC	28
2.3 Pemeriksaan Molekular Mutasi TP53	31
2.3.1 Imunohistokimia	32
2.3.2 <i>Polymerase Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	33
2.3.3 <i>Polymerase chain reaction - Single-strand conformation polymorphism</i> ...	35
2.3.4 <i>Sanger Sequencing</i>	36

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN 38

3.1 Kerangka Konseptual.....	38
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual.....	39
3.3 Hipotesis Penelitian.....	40

BAB 4 METODE PENELITIAN..... 42

4.1 Jenis Penelitian.....	42
4.2. Rancangan Penelitian	42
4.3 Subyek Penelitian dan Besar Sampel.....	42
4.3.1 Subyek Penelitian.....	42
4.3.2 Besar Sampel.....	43
4.4 Variabel Penelitian	43
4.4.1 Variabel Bebas	43
4.4.2 Variabel Antara	44
4.4.3 Variabel Tergantung.....	44
4.4.4 Variabel Terkendali.....	44
4.5 Definisi Operasional.....	44
4.6. Waktu Penelitian dan Tempat Penelitian	47
4.6.1 Waktu Penelitian	47
4.6.2 Tempat Penelitian.....	47
4.7 Bahan dan Alat Penelitian.....	48
4.7.1 Bahan Penelitian	48
4.8. Prosedur Penelitian.....	55
4.8.1 Pengumpulan Sampel.....	55
4.8.2 Pemeriksaan Derajat Diferensiasi Histopatologis dengan Pengecatan HE..	56
4.8.3 Pemeriksaan Ekspresi Protein p53 Dengan Sediaan IHK.....	57
4.8.4 Pemeriksaan Gen TP53 Dengan PCR-RLFP	58
4.8.4.1 Ekstraksi DNA	58
4.8.4.2 Amplifikasi Gen TP 53 Menggunakan PCR dan Elektroforesis.....	60
4.8.4.3 Elektroforesis Pasca PCR.....	62
4.8.4.4 Purifikasi DNA dari <i>Agarose Gel</i>	63
4.8.4.5 Pemeriksaan Mutasi Dengan RFLP	65

4.8.4.6 Elektroforesis Pasca RFLP.....	67
4.8.7 Analisis Statistik	68
4.9 Kerangka Operasional Penelitian.....	70
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	71
5.1 Persetujuan Komite Etik	71
5.2 Distribusi Penderita OSCC RSUD Dr. Soetomo	71
5.3 Hasil Pemeriksaan Mutasi Menggunakan Metode PCR-RFLP	73
5.4 Analisis Data Ekspresi p53 pada Penderita OSCC Terhadap Status Mutasi TP53 Ekson 5 Kodon 175 dan Ekson 7 Kodon 245	76
5.5 Analisis Hubungan Status Mutasi TP53 Ekson 5 Kodon 175 dan Ekson 7 Kodon 245 Dengan Derajat Diferensiasi Histopatologis	78
BAB 6 PEMBAHASAN	81
BAB 7 PENUTUP.....	92
7.1 Kesimpulan	92
7.2. Saran.....	93
DAFTAR PUSTAKA.....	94
LAMPIRAN.....	108

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 TNM stage untuk kanker rongga mulut	133
Tabel 2.2 Derajat diferensiasi histopatologis OSCC.....	14
Tabel 4.1 Tabel Definisi Operasional.....	45
Tabel 4.2 Tabel waktu penelitian	47
Tabel 4.3 Tabel interpretasi kekuatan hubungan	69
Tabel 1.1 Distribusi sampel berdasarkan stadium OSCC.....	71
Tabel 5.2 Rerata ekspresi p53 pada sampel dengan dan tanpa mutasi TP53 ekson 5 kodon 175.....	76
Tabel 5.3 Rerata ekspresi p53 pada sampel dengan dan tanpa mutasi TP53 ekson 7 kodon 245.....	77
Tabel 5.4 Distribusi sampel berdasarkan stadium OSCC	728

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Karsinogenesis pada kanker rongga mulut	10
Gambar 2.2 Struktur gen TP53 pada manusia	17
Gambar 2.3 Histogram distribusi lokasi mutasi pada TP53.....	18
Gambar 2.4 Diagram struktur p53	24
Gambar 2.5 Peran p53 pada OSCC.....	27
Gambar 2.6 Pengaruh mutasi TP53 terhadap patogenesis OSCC.....	31
Gambar 2.7 Hasil PCR-RFLP	34
Gambar 2.8 Posisi <i>restriction site</i> (A) Hha1 dan (B).....	35
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian	38
Gambar 4.1 Lokasi pengenalan <i>restriction site</i> Hha1 dan hasil potong setelah RFLP.....	66
Gambar 4.1 Lokasi pengenalan <i>restriction site</i> Acl1 dan hasil potong setelah RFLP.....	67
Gambar 4.3 Alur Penelitian.....	70
Gambar 5.1 Grafik karakteristik penderita OSCC RSUD Dr. Soetomo pada tahun 2014-2020.....	71
Gambar 5.2 Persebaran lokasi OSCC berdasarkan stadium penderita	72
Gambar 5.3 Hasil visualisasi elektroforesis pasca RFLP TP53 ekson 5 kodon 175.....	73
Gambar 5.4 Persentase jumlah sampel yang mengalami mutasi TP53 ekson 5 kodon 175.....	73
Gambar 5.5 Hasil visualisasi elektroforesis pasca RFLP TP53 ekson 7 kodon 245.....	74
Gambar 5.6 Persentase jumlah sampel yang mengalami mutasi TP53 ekson 7 kodon 245.....	75
Gambar 5.7 Gambar histopatologis pemeriksaan ekspresi p53 dengan pengecatan IHK.....	75
Gambar 5.8 Gambar histopatologis pengecatan HE pada OSCC (perbesaran 100x).	78
Gambar 5.9 Diagram <i>scatterplot</i> ekspresi p53 terhadap derajat diferensiasi histopatologis OSCC.....	79

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik	108
Lampiran 2. Hasil analisis statistik	109
Lampiran 3. <i>Datasheet antibody</i> IHK.....	134
Lampiran 4. <i>Datasheet reagen</i> PCR	135

DAFTAR SINGKATAN

Apaf1	: <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
Bak	: <i>Bcl2 homologous antagonist killer</i>
BAX	: <i>Bcl-2-associated X</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
BclXL	: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BER	: <i>Base Excision Repair</i>
BTG2	: <i>B-cell translocation gene 2</i>
CDK	: <i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKN2A	: <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CI	: <i>Confidence interval</i>
DAB	: <i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
DBD	: <i>DNA Binding Domain</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
E2F1	: <i>E2F transcription factor 1</i>
EAp53	: <i>Evolutionary action score of TP53</i>
EBV	: <i>Epstein-Barr virus</i>
EGFR	: <i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
FPPE	: <i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
G6PD	: <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GAPs	: <i>GTPase-activating proteins</i>
GDC	: <i>Gedung Diagnostic Center</i>
GEF-H1	: <i>Guanine nucleotide exchange factor-H1</i>
GLUT1	: <i>Glucose transporter 1</i>
GLUT 4	: <i>Glucose transporter 4</i>
GOF	: <i>Gain of function</i>
GRO	: <i>Growth-regulated oncogene</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
HCC	: <i>Hepatocellular carcinoma</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
HIER	: <i>Heat-Induced Epitope Retrieval</i>
HNSCC	: <i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	: <i>Human papillomavirus</i>
hnRNPK	: <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
Hsp90	: <i>Heat shock protein 90</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
ID4	: <i>inhibitors of differentiation 4</i>
IRF6	: <i>interferon regulatory factor 6</i>
KRAS	: <i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LOF	: <i>Loss of function</i>
mRNA IL8	: <i>messenger RNA interleukin 8</i>
MMP	: <i>Matriks metalloproteinase</i>
MDM2	: <i>Murine double minute 2 homolog</i>
MOMP	: <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>

NFW	: <i>Nuclease Free Water</i>
OSCC	: <i>Oral squamous cell carcinoma</i>
p53	: Protein 53
pb	: pasang basa
pRb	: <i>retinoblastoma</i>
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PIK3CA	: <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PPP	: <i>Pentose phosphate pathway</i>
PTEN	: <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	: <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RB1	: Retinoblastoma 1
RFLP	: <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RSUD	: Rumah Sakit Umum Daerah
SMF	: Staf Medis Fungsional
TE	: <i>Tris - EDTA</i>
TBE	: <i>Tris-borate-EDTA</i>
TCGA	: <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TIGAR	: <i>TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase</i>
<i>TNM stage</i>	: Klasifikasi Tumor, Nodul limfe, Metastasis
TP53	: Tumor Protein 53
TP63	: Tumor Protein 63
UV	: <i>Ultraviolet</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular endothelial growth receptor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
WT	: <i>Wildtype</i>