

siRNA E6 dalam Inhibisi Telomerase sebagai Agen Terapi Kanker Leher Rahim dengan Metode Immunositokimia

Adrian Prasetya*, M. Rasjad Indra **, Yuyun Yueniwati P. W ***

*Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

**Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Laboratorium Radiologi Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar

ABSTRAK

Kanker serviks disebabkan oleh Human Papilloma Virus (HPV) beresiko tinggi tipe 16 dan 18 yaitu virus yang mampu menginvasi sel skuamosa yang terdapat pada serviks manusia. HPV yang menginfeksi serviks akan mengekspresikan protein E6 yang mampu menonaktifkan protein P53. siRNA (small interfering ribonucleic acid) E6 merupakan suatu RNA yang mampu menghambat aktivasi protein E6 di dalam tubuh secara spesifik. Mekanisme molekular yang terlibat dalam prevensi adalah inhibisi yang dilakukan oleh siRNA terhadap protein E6 diharapkan mampu mengendalikan proliferasi sel kanker serviks dengan efek samping yang rendah pada sel normal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek siRNA pada sel kanker serviks (HeLa Cell line) dengan mengamati kadar protein telomerase dan menghitung dosis optimum siRNA E6 dalam menghambat proliferasi sel kanker leher rahim. Desain penelitian yang digunakan adalah menyintesis siRNA E6 dan mengkonjugasikanya kedalam sel HeLa menggunakan Lipofectamine™2000 dengan dosis 0 µg sebagai kontrol dan 0,5 µg, 1 µg, dan 2µg sebagai perlakuan. Hasil perlakuan akan diamati menggunakan immunositokimia untuk melihat kadar kualitatif protein telomerasenya. Purifikasi dan identifikasi antibodi telomerase menggunakan metode Western Blotting dan ELISA. Hasil dari immunositokimia menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sel HeLa yang terpulas coklat berbanding lurus dengan peningkatan dosis siRNA E6. Kesimpulan dari penelitian ini adalah siRNA E6 mampu ekspresi protein E6 pada kultur sel kanker serviks.

Kata kunci: kanker serviks, HPV, siRNA E6, Protein E6, Telomerase

E6 siRNA in Telomerase Inhibition as a Therapeutic Agent for Cervical Cancer with Immunocytochemistry Methods

Adrian Prasetya*, M. Rasjad Indra **, Yuyun Yueniwati P. W ***

*Medical Program Faculty of Medicine Brawijaya University

* Physiology Laboratory of Faculty of Medicine Brawijaya University

***Radiology Laboratory of dr. Saiful Anwar District General Hospital

ABSTRACT

Human cervical cancer is caused by high-risk types of human papillomavirus such as HPV types 16 and 18 that capable of invading squamous cells in human cervical. Results of infection will express the E6 protein that can disable the P53 protein. E6 siRNA (small interfering ribonucleic acid) is RNA that capable to inhibit activation of E6 protein in the body specifically. The molecular mechanism is done by the siRNA inhibition of the E6 protein that expected to control proliferation of cervical cancer cells with low side effects on normal cells. This study aims to determine the effect of siRNA on cervical cancer cells (HeLa cell line) by observing the telomerase protein content and measure the optimum dose of E6 siRNA inhibits proliferation of cancer cells. The design study is to synthesize and conjugate the E6 siRNA into HeLa cells using Lipofectamine™2000 with doses of 0 mg as the control and 0.5 mg, 1 mg, and 2µg as treatment. Results of treatment will be observed using immunocytochemistry to look at the qualitative level of telomerase protein. Purification and identification of telomerase antibody are using Western Blotting and ELISA. Results of immunocytochemistry showed that the increase in the number of HeLa cells were smeared chocolate is directly proportional to the increase in dose of siRNA E6. The conclusion is the E6 siRNA capable in expression of E6 protein in cervical cancer cell cultures.

Key words: cervical cancer, HPV, E6 siRNA, E6 protein, telomerase protein

1. PENDAHULUAN

Kanker leher rahim atau kanker serviks merupakan penyakit keganasan pada wanita terbanyak ketiga di dunia, dan merupakan keganasan penyebab kematian terbanyak kedua di negara-negara berkembang. Di Indonesia sendiri, kanker serviks merupakan pembunuh nomor satu akibat keganasan dengan presentase 25,91% dari seluruh kanker¹. Terdapat peningkatan insidensi kanker serviks dari 378.000 kasus per tahun pada tahun 1980 menjadi 454.000 kasus per tahun pada tahun 2010 (tingkat pertumbuhan jumlah kasus 0,6% tiap tahun). Angka kematian di negara-negara berkembang pada tahun 2010 adalah 200.000 jiwa, 46.000 di antaranya ada dalam rentang usia 15-49 tahun dan 106.000 lainnya berusia 50 tahun ke atas².

Human Papiloma Virus (HPV) diketahui merupakan penyebab absolut dari kanker serviks. HPV mampu menginvasi jaringan epitel sel skuamosa yang terdapat pada serviks manusia. Terdapat dua tipe HPV, *low-risk* HPV dan *high-risk* HPV. *High-risk* HPV (strain HPV16 & HPV18) merupakan penyebab kanker serviks manusia yang utama³. HPV yang menginvasi sel serviks, akan menghasilkan protein E6, di mana protein ini mampu menon-aktifkan aktivitas protein p53 sebagai regulator pembelahan sel dan meningkatkan ekspresi hTERT telomerase (*human telomerase reverse transcriptase*) yang dapat mengubah sel menjadi immortal⁴. Kombinasi regulasi E6 terhadap hTERT telomerase menyebabkan tingkat keganasan yang tinggi dan menyulitkan pengobatan pada kanker serviks. Pengobatan kanker yang sekarang banyak diterapkan antara lain kemoterapi, radioterapi dan pembedahan. Akan tetapi radiasi dan kemoterapi memiliki efek samping meru-

gikan terhadap sel normal dan sehat. Penyebaran jaringan kanker atau metastasis juga merupakan penyulit dalam pembedahan, sehingga pengangkatan seluruh organ genitalia kerap kali dilakukan⁵. Hal ini mengindikasikan pentingnya adanya suatu inovasi terapi yang mampu menghentikan kanker serviks, namun memiliki efek samping yang minimal pada sel normal.

siRNA (*small interfering ribonucleic acid*) merupakan senyawa yang secara spesifik dapat menghentikan ekspresi suatu protein di dalam sel. siRNA yang spesifik terhadap protein E6 memiliki kemampuan menghentikan ekspresi protein E6. Hambatan yang terjadi pada protein E6 juga menurunkan ekspresi protein telomeras, sehingga proliferasi kanker serviks dapat dihentikan. Protein E6 hanya diekspresi oleh sel serviks yang terinfeksi HPV sehingga siRNA E6 secara spesifik hanya akan mempengaruhi sel kanker dan tidak memiliki pengaruh pada sel normal di sekitarnya, sehingga terapi menggunakan siRNA E6 diharapkan mampu memiliki efektifitas yang tinggi pada sel kanker leher rahim namun tidak bereaksi dengan sel normal. Terapi kanker serviks menggunakan siRNA diharapkan dapat menjadi pilihan terapi yang efektif, spesifik dan minimal efek samping.

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh bukti bahwa siRNA E6 mampu menurunkan ekspresi protein E6 pada kultur sel kanker serviks (HeLa cell line) sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen terapi kanker serviks.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*)

di laboratorium secara *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*. Sampel penelitian adalah sel kanker leher rahim dari kultur sel *HeLa*. Desain penelitian yang digunakan adalah mengonjugasikan *siRNA E6* dengan dosis 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg ke dalam sel *HeLa* menggunakan *Lipofectamine™ 2000*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *siRNA E6* yang dipaparkan pada kultur sel kanker serviks. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah banyaknya ikatan antigen-antibodi E6 pada sel *HeLa* setelah perlakuan dengan *siRNA E6* melalui pengecatan dengan imunositokimia.

2.2 Sintesis siRNA

siRNA disintesis dengan menghasilkan rantai *double strand RNA* yang merupakan suatu *complementary* nukleotida mRNA tertentu. Untuk menghasilkan *siRNA*, dilakukan pengambilan data protein E6 pada situs NCBI. Protein E6 yang didapatkan dari situs NCBI, selanjutnya dilakukan pengambilan FASTA yang merupakan susunan asam nukleat E6. Sintesa dilakukan menggunakan perusahaan pembuat *siRNA* yaitu *dharmacon*. Rantai asam nukleat dari protein E6 digunakan dalam menghasilkan *complementary siRNA* yang spesifik terhadap protein E6.

2.3 Produksi Antibodi Telomerase

Antibodi Telomerase dihasilkan dengan cara meninjeksikan antigen protein telomerase kedalam tubuh kelinci jantan berusia 14-16 minggu secara *intra muscular*. Respon imunitas tubuh kelinci terhadap antigen yang disuntikan akan merangsang pembentukan antibodi *igG* pada tubuh kelinci. 200µL protein telomerase yang telah disediakan selanjutnya diencerkan (1 mg/mL) pada *Tris-Cl* lalu diemuskan dengan

Freud adjuvant dengan konsentrasi 1:1 dan diinjeksikan secara *intramuscular* pada tubuh kelinci pada minggu pertama, ketiga, dan minggu ke delapan pasca perlakuan. Antibodi yang dihasilkan pada tubuh kelinci dipanen melalui darah pada *vena auricularis* menggunakan spuit 3cc dan *vacutainer heparin* untuk dilakukan penumpulan serum darah kelinci. Pengambilan darah dilakukan pada minggu sebelum perlakuan sebagai kontrol, minggu pertama hingga minggu kesepuluh pada setiap minggu. Serum yang terkumpul dianalisis menggunakan *Western blotting* dan *ELISA*⁶.

2.4 Purifikasi dan Pendeteksian Antibodi Telomerase

Purifikasi dilakukan pada serum yang dikumpulkan untuk menghasilkan *igG* murni, purifikasi menggunakan metode SAS 50 (*saturated ammonium sulfate 50*)⁷. Setelah didapatkan konsentrat antibodi *igG* poliklonal selanjutnya dilakukan *Western blotting* untuk melihat ikatan antibodi secara kualitatif dengan metode (*abcam, 2010*): *Running* antigen pada *SDS PAGE* lalu transfer protein pada kertas nitroselulosa. Untuk memastikan antigen telah tertransfer pada nitroselulosa, rendam kertas nitroselulosa pada *ponceau 1%* dan bilas dengan *skim milk 5%* lalu cuci dengan *TBS tween 0,05%*. Lanjutkan dengan inkubasi menggunakan biotin sebagai antibodi sekunder, lalu inkubasikan menggunakan substrat *TMB*. Adanya pita menunjukkan terbentuknya ikatan spesifik antigen-antibodi E6.

indirect ELISA (Enzyme Link Immuno Sorbent Assay) digunakan untuk melihat immunogenitas dari protein telomerase. Secara detail, metodenya: serum kelinci yang terkumpul diencerkan dengan *Assay buffer* dengan perbandingan

1:10. Hasil kemudian di inkubasikan semalam dalam suhu 4°C pada *microplate* ELISA, lalu cuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Tambahkan 50 μ L *blocking buffer*. Reagen dicuci dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100 μ L antibodi primer (anti-E6) dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder dalam *Tris Buffer Saline* 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Biotin digunakan sebagai antibodi sekunder, lalu TMB digunakan sebagai substrat. Hasil yang didapatkan dibaca pada ELISA reader dengan λ 405 nm⁸.

2.5 Kultur Sel HeLa

Sel HeLa dipanen dengan Tripsin-EDTA, lalu disentrifugasi selama 8 menit pada 1500 rpm, pelet yang didapatkan dikultur pada MEM yang sudah ditambahkan serum. Sel ditanam pada well dan diinkubasi 37°C, 95% udara, 5% CO₂, 100% kelembaban.

2.6 Perlakuan siRNA E6 pada Kultur HeLa melalui immunositokimia dan MTT assay

Untuk menkonjugasikan siRNA E6 agar dapat menembus inti sel HeLa, reagen Lipofectamine™ 2000 digunakan pada penelitian ini. Penggunaan Lipofectamine™ 2000 menggunakan protokol resmi Lipofectamine™ 2000. Setelah siRNA E6 terkonjugasi dalam Lipofectamine™ 2000, kompleks ini memiliki kemampuan dalam menembus membran sel dan mencapai mRNA E6 yang spesifik. Pengaruh penurunan ekspresi dari protein E6 pada protein telomerase dapat diamati menggunakan antibodi telomerase dengan teknik Immunositokimia dengan cara : preparat yang telah disiapkan diinkubasikan menggunakan antibodi primer selama semalam (4°C), lalu cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Inkubasikan

menggunakan antibodi sekunder *anti rabbit* (biotin) selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya tetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*), inkubasi 40 menit lalu tetesi dengan DAB (*Diamano Benzidin*) dan diinkubasi 10 menit. Tetesi dengan *Mayer Hematoxylin* sebagai *Counterstain* (10 menit). Preparat positif apabila terdapat warna coklat pada preparat. MTT Assay dilakukan setelah 6 hari perlakuan menggunakan antibodi E6 dan Lipofectamine™2000. Setelah itu, nilai absorbansinya diamati dengan ELISA Reader, pada panjang gelombang 570 nm. Respirasi/pernapasan sel dapat diamati melalui banyaknya cahaya yang diserap oleh protein metabolit hasil pernapasan sel HeLa yang hidup setelah diberikan dosis perlakuan siRNA E6, yaitu 0.5 μ g, 1 μ g, dan 2 μ g.

2.7 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

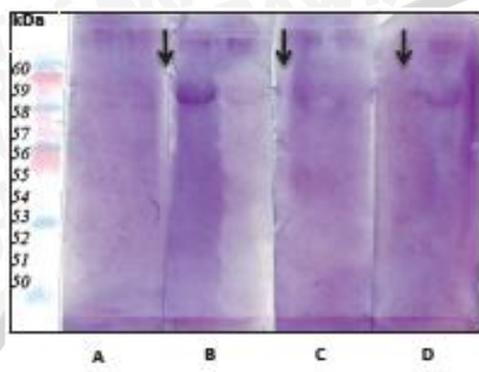
Hasil pengukuran dianalisa dengan menggunakan program statistik SPSS. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*. Untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way anova*. Penelitian ini dinilai bermakna bila $p < 0,05$ ⁹.

3. HASIL

Antibodi dideteksi menggunakan metode *Western Blotting* dan ELISA. Sebelumnya telah dilakukan elektroforesis terhadap *telomerase mouse peptide*, dan didapati bahwa berat molekulnya 58 kDa. Melalui *Western Blotting*, didapatkan adanya ikatan antara antigen-antibodi yang adekuat, yang mana ditandai dengan adanya pene-

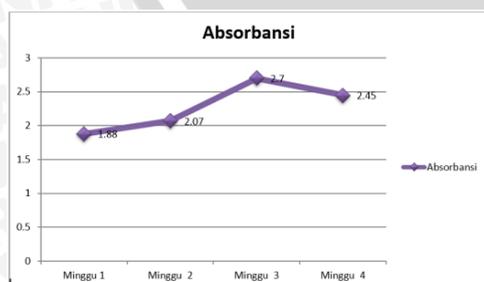
balan pita pada membran nitroselulosa pada berat molekul yang 58 kDa.

Gambar 1 . Hasil pita Western Bolt



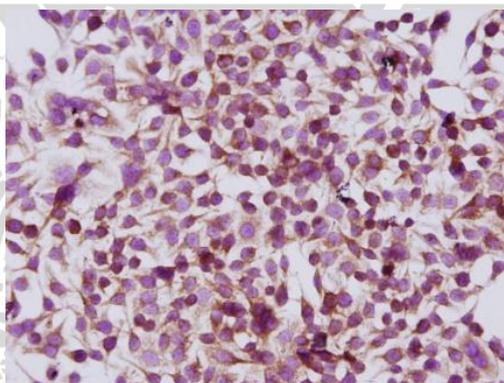
Hasil uji *immunoblotting* antara antibodi telomerase yang dihasilkan penelitian ini dengan enzim telomerase menunjukkan bahwa sampai pada minggu ke-5 antibodi telomerase masih terdeteksi didalam tubuh kelinci. Produksi antibodi telomerase ini dilakukan dengan booster 2 kali. Pada minggu 1-3 terjadi kenaikan produksi antibodi telomerase dan menurun pada minggu ke-4. Pada minggu ke-5 produksi meningkat lebih tinggi, hal ini terjadi karena adanya sel memori yang pernah terpapar sebelumnya. Hasil ini juga menunjukkan bahwa antibodi telomerase mengenali secara spesifik telomerase yang diproduksi oleh sel kanker

Gambar 2. Hasil uji titer ELISA antibodi Telomerase

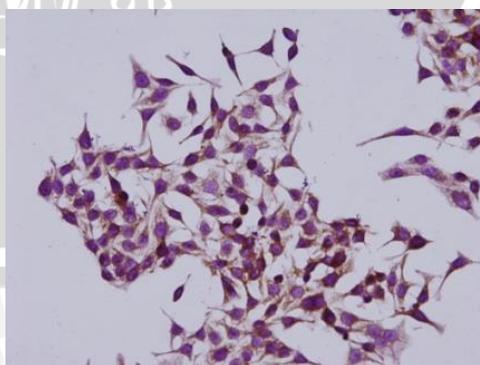


Selanjutnya dilakukan terapi terhadap sel HeLa dengan menggunakan siRNA E6 yang telah dikonjugasikan dengan Lipofectamine 2000. Adapun dosis siRNA E6 yang digunakan adalah 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg. Medium yang digunakan adalah Serum Free Medium. Setelah dilakukan inkubasi selama 48 jam dilakukan immunositokimia dan MTT assay. Hasil immunositokimia didapatkan peningkatan jumlah sel HeLa yang terpulas coklat berbanding lurus dengan peningkatan dosis siRNA E6.

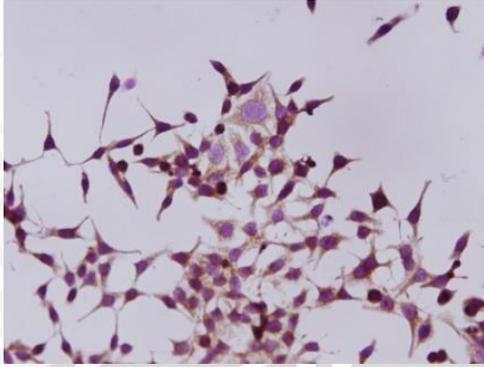
Gambar 3. Hasil immunositokimia kontrol



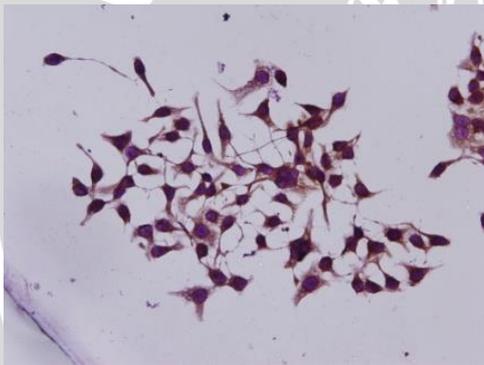
Gambar 4. Hasil immunositokimia dosis siRNA E6 0,5 µg



Gambar 5. Hasil immunositokimia dosis siRNA E6 1 µg



Gambar 6. Hasil immunositokimia dosis siRNA E6 2 µg



4. PEMBAHASAN

Subjek pada penelitian ini adalah sel kanker serviks dari kultur HeLa *cell line*. Sel HeLa yang telah disubkultur dalam *plate 12-well* kemudian dipaparkan dengan siRNA E6 yang telah terkonjugasi dengan *Lipofectamine™ 2000* dengan dosis paparan siRNA E6 sebesar 0 µg sebagai kontrol, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan immunositokimia dengan antibodi primer, antibodi telomerase. Antibodi telomerase didapatkan dengan menginjeksikan antigen telomerase ke dalam tubuh kelinci jantan berusia 14-16

minggu. Darah yang mengandung serum antibodi poliklonal telomerase yang telah dipanen dideteksi ikatannya dengan menggunakan Western Blot dan ELISA. Dari hasil Western blot dan ELISA menunjukkan bahwa antibodi telomerase telah berhasil diproduksi oleh tubuh kelinci.

Antibodi dibentuk oleh sistem imun akibat masuknya antigen ke dalam tubuh. Bila antigen masuk kedalam tubuh, maka ia akan dikenali sebagai bahan yang terikat dengan reseptor *Human Leukocyte Antigen (HLA)* tertentu pada makrofag. Makrofag mencerna molekul asing tersebut dan menampilkan ikatan tertentu dari kelompok luar atom yang disebut *epitop* pada permukaan dari makrofag. Epitop tersebut kemudian kontak dengan limfosit T helper, yang menolong menampilkan epitop tersebut pada limfosit sel B. Sel B akan mensintesa rantai protein immunoglobulin yang mampu mengikat epitop secara spesifik. Setiap bahan antigen memiliki epitop yang banyak, yang mampu berikatan dengan antibodi. Secara *in vivo*, respons terhadap antigen dapat bersifat luas dan antibodi yang bereaksi dengan determinan-determinan pada antigen ini disebut *antibodi poliklonal*.

Prinsip dari metode immunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai adanya reaksi antara antigen dengan antibodi, dan reaksi kimiawi ditandai adanya reaksi antara enzim dengan substrat. Pemeriksaan immunohistokimia dimaksudkan untuk mengenali bahan spesifik tertentu didalam jaringan dengan menggunakan antibodi dan sistem deteksi yang memungkinkan untuk mengenali bahan spesifik tersebut secara visual. Antibodi-antibodi penentu (anti-antibodi dari spesies lain) ini ditemplei (tagged) dengan beberapa *reporter molecule* yang dapat mengkatalisa

reaksi selanjutnya menuju produk yang dapat dilihat. Sistem deteksi Avidin-biotin complex (ABC) menggunakan spesimen sel tertanam dalam paraffin, dengan ketebalan 5 mikron. Antibodi spesifik terhadap bahan spesifik yang diperiksa dikombinasi dengan antigen. Antibodi ini ditentukan dengan anti-antibodi yang dihasilkan oleh spesies lain yang mengenal antibodi pertama sebagai antigen. Anti-antibodi (antibodi sekunder) ini mempunyai molekul biotin yang lekat padanya, memungkinkan deteksi lanjut dengan protein avidin.

Molekul Horse Radish Peroxidase (HRP) adalah molekul reporter. Enzim ini diikat oleh biotin dan berpadu didalam complex avidin-biotin sedemikian rupa sehingga bila HRP ini berdekatan dengan anti-antibodi terbiotinil sekunder (secondary biotinylated anti-antibody), complex tersebut berikatan dengan tempat ikatan biotin pada satu dari molekul avidin. Hal ini membuat enzim pada tempat asli dari interaksi antibodi primer-antigen.

Kemudian enzim tersebut bereaksi dengan hydrogen peroxidase. Hal ini menimbulkan transfer elektron-elektron dari senyawa chromogen yang mengendap (precipitates) sebagai pigmen yang tidak larut (insoluble). Chromogen yang digunakan adalah 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Bila teroksidasi molekul ini didalam larutan dalam konsentrasi terlarut akan mengendap berupa massa coklat gelap (positif).

Dari hasil immunositokimia, didapatkan dosis siRNA 0,5 µg, 1 µg dan 2 µg yang diberikan pada kultur sel HeLa terjadi perubahan pulasan warna inti sel HeLa menjadi coklat. Hal ini menandakan bahwa seiring dengan peningkatan dosis siRNA yang diberikan, terdapat peningkatan ikatan anta-

ra antibodi telomerase dengan antigen telomerase yang menandakan bahwa tingkat proliferasi sel HeLa menurun dan terjadi kematian dan sel kanker serviks secara kualitatif. Hal tersebut membuktikan hipotesis penelitian yang menyatakan bahwa siRNA E6 mampu menurunkan ekspresi protein E6 pada kultur sel kanker serviks (HeLa cell line). Oleh karena itu siRNA E6 dapat dijadikan metode alternatif dalam terapi kanker leher rahim dalam tahap in vitro melalui pengamatan immunositokimia.

5. KESIMPULAN

1. Tubuh kelinci yang diinjeksikan antigen telomerase, merespon dengan membentuk antibodi telomerase. Hal ini dibuktikan dengan adanya penebalan pita pada 58 kDa pada Western Blot dan peningkatan produksi antibodi pada minggu ketiga dan minggu kelima pada ELISA¹¹.
2. Seiring dengan peningkatan dosis siRNA e6 yang diberikan pada sel HeLa terjadi peningkatan pulasan warna coklat pada inti sel HeLa.
3. Kosentrasi optimal siRNA E6 dalam menginduksi kematian kanker serviks melalui pengamatan immunositokimia pada kultur sel kanker serviks (HeLa cell lines) setelah terpapar siRNA E6 belum dapat diketahui.

6. SARAN

Untuk meningkatkan kemanfaatan hasil penelitian ini, disarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan metode MTT secara kuantitatif

untuk menentukan dosis optimal siRNA dalam menurunkan ekspresi protein E6.

2. Perlu dilakukan penelitian dengan dosis siRNA E6 yang lebih bervariasi dan penelitian in vivo pada hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

1. National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention. 2010. Fact Sheet: Genital HPV, (online) (<http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>, diakses 26 Juli 2011)
2. Chaturvedi, Anil; Maura L. Gillison (March 4, 2010). "Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer". In Andrew F. Olshan. *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer* (1st ed.). New York: Springer. ISBN 978-1-4419-1471-2
3. Ganguly, N.; Parihar, S. P. 2009. "Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis". *Journal of biosciences* 34 (1): 113–123. doi:10.1007/s12038-009-0013-7. PMID 19430123.
4. Pourhassan Mohammad, Zarghami Nosratollah*, Rahmati Mohammad, Alibakhshi Abbas, Ranjbari Javad. 2010. The inhibitory effect of Curcuma longa extract on telomerase activity in A549 lung cancer cell line. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (6), pp. 912-919
5. Cohen S, Graham M, Lovrecz G, Bache N, Robinson P, Reddel R (2007). "Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells". *Science* 315 (5820): 1850–3 doi:10.1126/science.1138596. PMID 17395830.
6. Florida State University. 2007. Polyclonal Antibody Production Protocol-Rabbits.
7. Liddell, JE. 2003. Antibody Purification By Ammonium Sulfate Precipitation. University of Cardiff
8. Abcam. 2010. Indirect ELISA and Western Blotting Protocol.
9. Hanafiah. 2005. Statistik Kedokteran. Jakarta: Bumi Cipta
10. X, Liu; J, Robert; A, Dakic; Y, Zhang; R, Shiegel (2008). HPV E7 Contributes To The Telomerase Activity of Immortalized And Tumorigenic Cells and Augments E6-Induced hTERT Promoter Function. Department of Pathology and Oncology, Georgetown University Medical School, Washington, DC 20057, USA. *Virology*. 375(2):611-23. Epub 2008 Mar 26