

BUNGA RAMPAI

TEKNIK DIAGNOSTIK MOLEKULER
DALAM DETEKSI PENYAKIT



PENULIS :

- KURNIAWAN
- SATRIANI SYARIF
- KHOIRUL ANWAR
- NILASARI INDAH YUNIATI
- SORAYA
- FEBRI SEMBIRING
- LUH ADE WILANKRISNA
- ALIF RAHMAN HABIBI
- PUTRI WIDELIA WELKRIANA
- SHARFINA MAULIDAYANTI
- PUJI LESTARI
- NOOR ANDRYAN ILSAN
- ARAFAH NURFADILLAH
- AL HIDAYANI
- MAROLOAN ARUAN
- MERI WULANDARI

Editor : **Jumriah Nur**

BUNGA RAMPAI TEKNIK DIAGNOSTIK MOLEKULER DALAM DETEKSI PENYAKIT

Penulis:

Kurniawan; Satriani Syarif; Khoirul Anwar
Nilasari Indah Yuniati; Soraya; Febri Sembiring
Luh Ade Wilankrisna; Alif Rahman Habibi
Putri Widelia Welkriana; Sharfina Maulidayanti
Puji Lestari; Noor Andryan Ilsan; Arafah Nurfadillah
Al Hidayani; Maroloan Aruan; Meri Wulandari

Editor:

Jumriah Nur



PT. Mustika Sri Rosadi

TEKNIK DIAGNOSTIK MOLEKULER DALAM DETEKSI PENYAKIT

Penulis:

Kurniawan; Satriani Syarif; Khoirul Anwar; Nilasari Indah Yuniati; Soraya; Febri Sembiring; Luh Ade Wilankrisna; Alif Rahman Habibi; Putri Widelia Welkriana; Sharfina Maulidayanti; Puji Lestari; Noor Andryan Ilsan; Arafah Nurfadillah; Al Hidayani; Maroloan Aruan; Meri Wulandari.

Editor: Jumriah Nur

Layout: Tim PT. Mustika Sri Rosadi

Desain Sampul: Hapsah Meta

ISBN: 978-634-04-2121-7 (PDF)

Cetakan Pertama: 23 Juli 2025

Hak Cipta 2025

Hak Cipta Dilindungi Oleh Undang-Undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

Diterbitkan oleh Penerbit PT Mustika Sri Rosadi

Alamat Penerbit: Citra Indah City, Bukit Heliconia AG
23/32, Kecamatan Jonggol, Kab. Bogor.

Email: mars.mustikasrirosadi@gmail.com

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga Buku Bunga Rampai ini yang berjudul “Teknik Diagnostik Molekuler dalam Deteksi Penyakit” dapat disusun dan diterbitkan.

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang biomedik, khususnya diagnostik molekuler, telah membawa perubahan besar dalam pendekatan diagnosis penyakit. Deteksi dini, pemantauan terapi, hingga identifikasi patogen dan mutasi genetik kini dapat dilakukan dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang jauh lebih tinggi melalui teknik-teknik molekuler.

Chapter ini disusun untuk memberikan pemahaman komprehensif kepada mahasiswa, praktisi laboratorium, maupun tenaga kesehatan lainnya mengenai dasar-dasar dan aplikasi diagnostik molekuler dalam konteks klinis. Penulis menyadari bahwa penyusunan chapter ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, saran dan masukan dari pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan di masa mendatang.

Akhir kata, semoga chapter ini dapat menjadi referensi yang bermanfaat dalam proses belajar dan praktik profesional di bidang laboratorium diagnostik molekuler.

Bogor, 23 Juli 2025

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
PENDAHULUAN-Jumriah Nur	1
BAB 1. PRINSIP DASAR DIAGNOSTIK MOLEKULER- Kurniawan	3
A. Pendahuluan.....	3
B. Definisi Diagnostik Molekuler	5
C. Peran Penting Diagnostik Molekuler dalam Kesehatan Modern	7
D. Teknik Atau Metode Diagnostik Molekuler	10
E. Jenis Sampel, Penanganan dan <i>Quality Control</i> dari Diagnostik Molekuler	24
F. Keunggulan Diagnostik Molekuler.....	26
G. Penerapan Diagnostik Molekuler pada Kasus-Kasus Penyakit	29
H. Tantangan yang Dihadapi oleh Diagnostik Molekuler	32
I. Prospek Masa Depan Diagnostik Molekuler	35
J. Daftar Pustaka	39
BAB 2. TEKNIK PCR DALAM DIAGNOSIS PENYAKIT INFEKSIUS- Satriani Syarif.....	44
A. Pendahuluan.....	44
B. Langkah awal sebelum PCR	46
C. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	52

D. Peran PCR dalam Diagnosis penyakit infeksius.....	55
E. Penutup	60
F. Daftar Pustaka.....	61
BAB 3. REAL-TIME PCR DAN APLIKASINYA DALAM	
DIAGNOSTIK KLINIS- Khoirul Anwar	62
A. Pendahuluan.....	62
B. Dasar-Dasar Real-Time PCR.....	63
C. Variasi Teknik Real-Time PCR.....	64
D. Pemanfaatan dalam Diagnostik Klinis.....	65
E. Keunggulan dan Tantangan dalam Penggunaannya...	68
F. Kesimpulan.....	69
G. Daftar pustaka.....	70
BAB 4. TEKNIK <i>MICROARRAY</i> DALAM <i>PROFILING</i>	
GENETIK PENYAKIT- Nilasari Indah Yuniati	72
A. Pendahuluan.....	72
B. Konsep Dasar dan Prinsip Kerja <i>Microarray</i>	73
C. Komponen <i>Microarray</i>	76
D. Jenis-Jenis <i>Microarray</i>	78
E. Aplikasi <i>Microarray</i> dalam <i>Profiling</i> Ekspresi Gen	82
F. Keunggulan dan Kelemahan <i>Microarray</i>	84
G. Penutup	85
H. Daftar Pustaka	86
BAB 5. SEQUENCING DNA DAN RNA	88
DALAM DIAGNOSTIK MEDIS- Soraya	88
A. Pendahuluan.....	88

B. Teknologi DNA Sequencing.....	89
C. Teknologi RNA Sequencing.....	92
D. Aplikasi Sequencing dalam Diagnostik Medis.....	95
E. Analisis dan Interpretasi Data Sequencing	97
F. Penutup	98
G. Daftar Pustaka.....	99

BAB 6. METODE CRISPR DALAM DETEKSI PENYAKIT

GENETIK- Febri Sembiring101

A. Pendahuluan.....	101
B. Prinsip Dasar Sistem CRISPR-Cas.....	102
C. Teknologi Diagnostik Berbasis CRISPR.....	103
D. Aplikasi CRISPR dalam Deteksi Penyakit Genetik	107
E. Keunggulan dan Kelebihan Metode CRISPR dibandingkan Teknologi Konvensional	109
F. Tantangan dan Batasan Teknologi CRISPR dalam Diagnostik.....	112
G. Perkembangan Komersial dan Implementasi Klinis...	113
H. Prospek Masa Depan dan Inovasi Lanjutan.....	114
I. Penutup	115
J. Daftar Pustaka.....	115

BAB 7. DIAGNOSTIK MOLEKULER UNTUK PENYAKIT

KANKER- Luh Ade Wilankrisna117

A. Pendahuluan.....	117
B. Teknik diagnostik molekuler.....	118
C. Daftar Pustaka.....	136

**BAB 8. DETEKSI BIOMARKER MOLEKULER DALAM
PENYAKIT AUTOIMUN- Alif Rahman Habibi140**

A. Pendahuluan.....	140
B. Kelas Biomarker.....	143
C. Biomarker Molekuler.....	146
D. Jenis Utama Biomarker Molekuler.....	148
E. Konsep Dasar Penyakit Autoimun.....	153
F. Metode Deteksi Biomarker Molekuler.....	156
G. Biomarker Spesifik Dalam Beberapa Penyakit Autoimun	158
H. Daftar Pustaka.....	162

**BAB 9. DIAGNOSTIK MOLEKULER DALAM PENYAKIT
METABOLIK- Putri Widelia Welkriana166**

A. Pendahuluan.....	166
B. Teknik dalam diagnostik molekuler beberapa penyakit metabolik.....	167
C. Penutup.....	181
D. Daftar Pustaka.....	182

**BAB 10. TEKNIK DIAGNOSTIK MOLEKULER UNTUK
PENYAKIT LANGKA-Sharfina Maulidayanti184**

A. Pendahuluan.....	184
B. Teknik-Teknik Utama dalam Diagnostik Molekuler...	187
C. Studi Kasus Penggunaan.....	188
D. Tantangan dan Keterbatasan.....	190

E. Masa Depan Diagnostik Molekuler dalam Penyakit Langka.....	190
F. Kesimpulan.....	194
G. Daftar Pustaka.....	195
BAB 11. PENGGUNAAN LIQUID BIOPSY DALAM DETEKSI KANKER- Puji Lestari	197
A. Pendahuluan.....	197
B. <i>Liquid Biopsy</i> dan Manfaatnya dalam Tatalaksana Kanker	198
C. <i>Cell-free</i> DNA (cfDNA) dan <i>Circulating Tumor</i> DNA (ctDNA)	204
D. Cara Ekstraksi ctDNA dari <i>Liquid Biopsy</i>	206
E. Tantangan dan Keterbatasan dalam Penggunaan <i>Liquid Biopsy</i>	208
F. Penutup	209
G. Daftar Pustaka.....	210
BAB 12. MULTIPLEX PCR DALAM DETEKSI MULTIPATHOGEN- Noor Andryan Ilsan	214
A. Pendahuluan.....	214
B. Infeksi Pernafasan.....	217
C. Infeksi aliran darah.....	219
D. Infeksi yang ditularkan melalui makanan dan minuman	220
E. Penyakit infeksi saluran kemih.....	222
F. Daftar Pustaka.....	223

BAB 13. KEUNTUNGAN DAN TANTANGAN DIAGNOSTIK MOLEKULER- Arafah Nurfadillah	225
A. Pendahuluan.....	225
B. Keuntungan Diagnostik Molekuler	225
C. Tantangan Diagnostik Molekuler.....	232
D. Daftar Pustaka	234
BAB 14. ETIKA DAN REGULASI DALAM DIAGNOSTIK MOLEKULER-AI Hidayani.....	237
A. Pendahuluan.....	237
B. Isu Etika dalam Diagnostik Molekuler.....	237
C. Isu Etika dalam Database DNA	238
D. Regulasi dan Pedoman Internasional.....	241
E. Regulasi yang Relevan	245
F. Daftar Pustaka	248
BAB 15. INTEGRASI DIAGNOSTIK MOLEKULER DENGAN BIG DATA DAN AI-Maroloan Aruan.....	251
A. Pendahuluan.....	251
B. Diagnostik Molekuler	252
C. <i>Big Data</i> dalam Kesehatan	254
D. Kecerdasan Buatan/ <i>Artificial intelligence</i> (AI) dalam Diagnostik Molekuler	259
E. Integrasi Diagnostik Molekuler, Big Data, dan AI.....	264
F. Penutup	268
G. Daftar Pustaka	269

BAB 16. INOVASI DIAGNOSTIK MOLEKULER DI MASA DEPAN- Meri Wulandari.....	274
A. Pendahuluan: Tren Global Diagnostik Molekuler	274
B. Teknologi Berbasis CRISPR untuk Deteksi Cepat	275
C. Diagnostik Berbasis AI dan Machine Learning	278
D. Teknologi Point-of-Care Molekuler (POCT).....	281
E. Liquid Biopsy dan Diagnostik Non-Invasif.....	282
F. Integrasi Multi-Omics untuk Diagnostik Komprehensif	285
G. Etika dan Regulasi dalam Diagnostik Masa Depan....	287
H. Daftar Pustaka	289
PENUTUP-Jumriah Nur	297
BIOGRAFI EDITOR	298
BIOGRAFI PENULIS	299
SINOPSIS.....	319

PENDAHULUAN

Oleh: Jumriah Nur

Perkembangan teknologi biomedis telah membawa revolusi dalam dunia diagnosis laboratorium. Salah satu pencapaian terpenting adalah diterapkannya diagnostik molekuler sebagai pendekatan yang sensitif, spesifik, dan cepat dalam mendeteksi berbagai penyakit, termasuk infeksi, kelainan genetik, dan kanker. Penggunaan pendekatan molekuler dianggap menjadi solusi dalam menurunkan resiko kematian pasien.

Diagnostik molekuler berfokus pada proses analisis DNA, RNA, dan protein yang digunakan untuk mengidentifikasi perubahan molekuler sebagai dasar terjadinya penyakit. Beberapa metode diagnostik molekuler diantaranya PCR, sekuensing, LAMP, *in situ hybridization (ISH)*, loop mediated isothermal amplification (LAMP) dan *microarray*. Contoh metode tersebut menjadi bagian penting dari pemeriksaan laboratorium modern.

Penerapan metode molekuler tidak hanya meningkatkan keakuratan hasil pemeriksaan, tetapi juga memungkinkan diagnosis dilakukan sejak tahap awal penyakit, bahkan sebelum gejala klinis muncul. Hal ini

tentu berdampak besar terhadap efektivitas terapi dan keberhasilan prognosis pasien.

Buku Bunga Rampai. ini akan membahas konsep dasar diagnostik molekuler, metode yang digunakan dalam mendeteksi berbagai penyakit, termasuk infeksi, kelainan genetik, dan kanker, serta aplikasinya dalam dunia medis dan laboratorium klinik. Pemahaman mendalam terhadap dasar-dasar ini sangat penting bagi tenaga laboratorium medik untuk menjamin mutu pemeriksaan serta menunjang praktik kedokteran berbasis bukti.

BAB 1. PRINSIP DASAR DIAGNOSTIK MOLEKULER

Oleh: Kurniawan

A. Pendahuluan

Perkembangan ilmu pengetahuan saat ini semakin berlangsung sangat cepat dan hal ini selalu diiringi atau didukung dengan adanya perkembangan teknologi. Ilmu pengetahuan dan teknologi merupakan dua sisi mata uang yang tidak dapat dipisahkan dan merupakan satu kesatuan yang saling mendukung dan mempengaruhi. Pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan akan melahirkan berbagai jenis teknologi yang mampu mempermudah aktivitas manusia sehari-hari. Sebaliknya, adanya penemuan-penemuan teknologi baru akan memacu berkembangnya cabang-cabang ilmu baru atau bidang kajian yang semakin dalam.

Adanya kemajauan ilmu pengetahuan dan teknologi akan meningkatkan kesejahteraan manusia di semua bidang dan lini kehidupan. Kehidupan masyarakat yang awalnya hanya mengandalkan pada pemanfaatan sumber daya alam yang tersedia di sekitar tempat tinggal, namun saat ini hal tersebut sudah tidak relevan lagi, mengingat adanya perubahan pada pola pikir dan kebiasaan masyarakat yang lebih dinamis dan cepat, yang hal ini hanya dapat dicapai dengan adanya

teknologi sebagai alat bantu untuk mendukung berbagai aktivitas masyarakat.

Contoh konkrit dengan adanya pengaruh dari perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kesehatan diawali dengan penemuan mikroskop. Dulu, sebelum adanya mikroskop, para dokter dan ilmuwan kesulitan dalam menentukan jenis penyakit dan juga sumber penyebabnya. Namun setelah adanya mikroskop, para dokter dan ilmuwan dapat menemukan sel, unit terkecil kehidupan, dan juga berbagai jenis mikroba, baik itu virus, bakteri, jamur dan khamir dari sampel-sampel klinis yang menjadi sumber penyebab munculnya beragam penyakit infeksi.

Seiring dengan munculnya cabang ilmu biologi molekuler, maka, pemeriksaan dan diagnosis penyakit tidak lagi bergantung pada pemeriksaan gejala yang muncul, tetapi mulai bergeser pada analisis materi genetik berupa asam nukleat (DNA, RNA, atau protein) yang terdapat pada beragam sampel biologis. Oleh karena itu, ilmu biologi molekuler menjadi tonggak awal berkembangnya metode diagnosis penyakit berbasis molekuler atau yang dikenal dengan istilah diagnosis molekuler atau patologi molekuler.

Melalui metode ini, pemeriksaan dan diagnosis penyakit dapat dilakukan dengan cepat, efektif dan efisien, tidak lagi harus menunggu sampai berhari-hari. Metode ini dapat menjadi metode utama untuk

melengkapi berbagai kekurangan yang dimiliki oleh metode konvensional. Meskipun penerapan metode diagnosis molekuler saat ini baru diterapkan secara terbatas pada beberapa jenis penyakit, tidak menutup kemungkinan dalam beberapa waktu yang akan datang, metode ini akan menjadi *gold standard* diagnosis penyakit di berbagai negara.

B. Definisi Diagnostik Molekuler

Terdapat beberapa definisi tentang diagnostik molekuler yang diajukan oleh beberapa ahli. Hal ini tentunya disesuaikan dengan *background* bidang ilmu spesifik dan juga objek riset yang ditekuni oleh para ahli tersebut. Namun pada hakikatnya, definisi tersebut mengacu pada pemanfaatan biologi molekuler sebagai dasar dalam proses pemeriksaan atau diagnosis suatu penyakit.

1. Diagnostik molekuler adalah istilah umum untuk serangkaian alat dan teknik yang melibatkan manipulasi dan analisis asam deksoribonukleat (DNA), asam ribonukleat (RNA), dan protein untuk memberikan wawasan tentang patogenesis dan atau prognosis suatu penyakit;
2. Diagnostik molekuler atau patologi molekuler didefinisikan sebagai suatu metode diagnosis penyakit yang melibatkan pengambilan DNA atau RNA, kode genetik yang ditemukan di dalam sel-sel

manusia, dan menganalisis urutannya untuk menemukan tanda-tanda bahaya yang dapat menunjukkan potensi munculnya penyakit tertentu;

3. Diagnostik molekuler merupakan metode laboratorium yang digunakan untuk membantu mengidentifikasi penyakit atau risiko berkembangnya penyakit seperti kanker dengan cara mempelajari molekul DNA, RNA, dan protein yang terdapat di dalam sampel jaringan atau cairan;
4. Diagnostik molekuler mencakup analisis genom manusia, virus, dan mikroba serta produk yang dikodekannya;
5. Diagnostik molekuler melibatkan semua alat dan teknik yang menggunakan DNA, RNA, dan protein untuk menjelaskan patogenesis dan prognosis;
6. Diagnostik molekuler adalah bidang kedokteran laboratorium yang menganalisis DNA atau RNA sel untuk menentukan potensi penyakit tertentu;
7. Diagnostik molekuler adalah cabang kedokteran laboratorium atau patologi klinis yang memanfaatkan teknik biologi molekuler untuk mendiagnosis penyakit, memprediksi perjalanan penyakit, memilih pengobatan, dan memantau efektivitas terapi;

Dari sekian banyak definisi tersebut, maka dapat diambil satu definisi yang komprehensif terkait diagnostik molekuler yaitu suatu teknik biologi molekuler yang berakar pada pengujian asam nukleat,

khususnya analisis DNA, RNA, dan protein untuk mendeteksi, mendiagnosis dan memantau penyakit pada tingkat molekuler.

Teknik ini bertujuan untuk mengungkap dan menganalisis penanda biologis (*biomarker*) di dalam genom dan proteom, menilai ekspresi gen, dan menerapkan informasi ini pada pengujian medis dan pengambilan keputusan pengobatan. Peneliti lain memandang diagnostik molekuler sebagai perubahan transformatif dari diagnosis berbasis gejala ke diagnosis berbasis molekul. Dalam praktik klinis, diagnostik molekuler telah menjadi bagian integral dari pengelolaan penyakit, memungkinkan deteksi dini, diagnosis yang akurat, dan strategi pengobatan yang disesuaikan.

C. Peran Penting Diagnostik Molekuler dalam Kesehatan Modern

Metode diagnostik molekuler telah merevolusi pengobatan modern, mengubah cara deteksi, pengobatan, dan pemantauan berbagai jenis penyakit terutama penyakit menular, kanker, dan kelainan genetik. Berikut ini adalah beberapa peran penting dari metode diagnostik molekuler pada beberapa jenis penyakit:

1. Penyakit Menular: Diagnosis Lebih Cepat, Lebih Akurat & Deteksi Resistensi

Metode molekuler seperti PCR dan *Next-Generation Sequencing* (NGS) telah menggantikan diagnostik tradisional yang lebih lambat dan kurang dapat diandalkan dalam manajemen penyakit menular. Metode PCR telah terbukti mampu mendeteksi patogen (virus, bakteri, jamur dan parasit) dengan cepat dan memiliki sensitivitas yang tinggi, serta menjadi senjata utama dalam penanganan pandemi COVID-19 di tahun 2020-2023. Metode NGS memungkinkan untuk menganalisis secara mendalam genom patogen (virus, bakteri, jamur dan parasit) untuk mengungkap sifat resistensinya terhadap antibiotik, melacak asal-usul sumber penyakit (wabah), dan mengkarakterisasi penyebaran mikroba patogen yang penting dalam pengelolaan epidemi dan menyesuaikan dengan terapi antimikroba yang dipilih.

2. Kanker: Deteksi Presisi, Prognosis & Panduan Terapi

Diagnostik molekuler mendukung era onkologi presisi. Analisis genotipe tumor melalui NGS dapat menunjukkan dan mengidentifikasi jenis mutasi pemicu yang dapat ditindaklanjuti, memandu terapi yang ditargetkan, dan membantu menyusun risiko

pasien. Teknik biopsi cair dapat menganalisis DNA tumor yang bersirkulasi (ctDNA) dan memungkinkan deteksi non-invasif terhadap *minimal residual disease* (MRD), pemantauan potensi untuk kambuh sejak dini, dan penilaian respons pengobatan secara *real-time*.

Pengujian lanjutan seperti MRD dapat menginformasikan adanya tumor (melacak mutasi spesifik pasien) dan MRD yang tidak bergantung pada tumor (menggunakan panel yang luas atau tanda metilasi) untuk meningkatkan pengawasan pasca perawatan. Dalam hal kanker hematologi, diagnostik molekuler akan mengintegrasikan kerangka kerja MICM (*Morphology, Immunology, Cytogenetics, and Molecular biology*) yang memungkinkan untuk melakukan klasifikasi secara tepat, penilaian risiko, dan perencanaan imunoterapi, dimana pendekatan ini juga menyoroti tentang bagaimana pengetahuan tentang molekuler sangat diperlukan dalam stratifikasi pengobatan.

3. Gangguan Genetik: Deteksi Dini & Manajemen Risiko yang Dipersonalisasi

Diagnostik molekuler dapat digunakan untuk identifikasi sejak dini dan pasti terhadap berbagai bentuk kelainan genetik, mengubah metode perawatan kesehatan dengan mengedepankan upaya preventif dan konseling pasien. Melalui

metode ini, dokter dapat mendeteksi mutasi bawaan sejak dini, yang memungkinkan dilakukannya intervensi dan strategi keluarga berencana yang disesuaikan. Hasil penelitian longitudinal menunjukkan bahwa nilai dari pengintegrasian data genomik dengan catatan pasien mampu meningkatkan dan menyempurnakan bentuk perawatan individual.

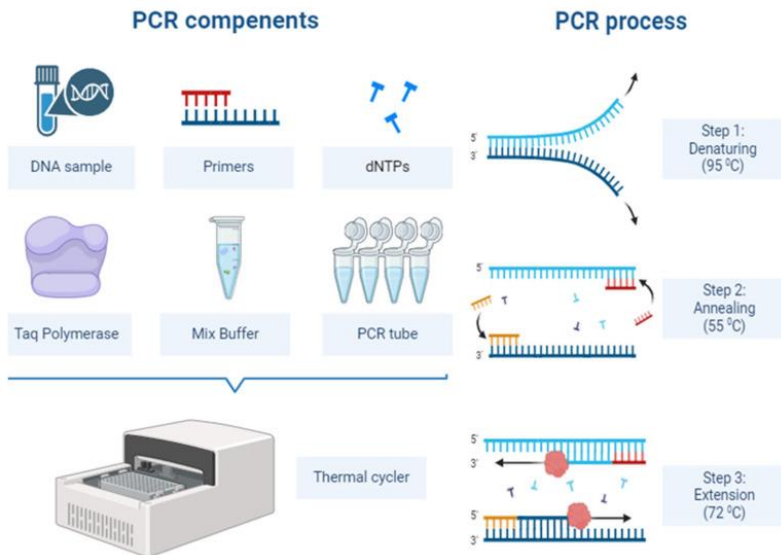
D. Teknik Atau Metode Diagnostik Molekuler

Saat ini, teknik yang paling umum digunakan dalam diagnostik molekuler meliputi *Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR (qPCR)/Multiplex PCR/Digital PCR (dPCR))*, *Next Generation Sequencing (NGS)*, metagenomik, *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*, dan metode diagnostik berbasis *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)*. Teknik-teknik ini tidak hanya mempercepat proses diagnostik tetapi juga memberikan informasi penting tentang struktur genetik agen infeksius, yang berkontribusi pada perencanaan pengobatan.

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Metode PCR merupakan landasan awal dan utama dari diagnostik molekuler yang dapat memperbanyak (amplifikasi) fragmen spesifik dari DNA target secara cepat sehingga memungkinkan deteksi dari sejumlah kecil materi genetik. Metode ini

memiliki sensitivitas yang tinggi dan menjadi *gold standard* dalam diagnosis penyakit menular untuk mendeteksi berbagai jenis mikroba (virus, bakteri, jamur, dan parasit).



Gambar 1.1 Prinsip Kerja Polymerase Chain Reaction (PCR)
(Sumber: Alsharksi *et al.*, 2024)

Prinsip PCR melibatkan penargetan wilayah DNA atau RNA tertentu dan memperbanyak wilayah ini menggunakan primer, yang memungkinkan deteksi patogen dalam pengaturan laboratorium. PCR digunakan secara luas dalam penyakit menular karena kemampuannya dalam mendeteksi DNA atau RNA patogen dan memberikan hasil yang sangat

sensitif dan spesifik, misalnya pada kasus infeksi virus HIV, Hepatitis B (HBV), dan Hepatitis C (HCV), infeksi bakteri seperti *M. tuberculosis*, *L. pneumophila*, dan *S. pneumoniae*.

Seiring berjalannya waktu, terdapat banyak tipe atau varian metode PCR, misalnya *Real-Time* PCR (qPCR), *Multiplex* PCR dan *Digital* PCR (dPCR). *Real-Time* PCR (qPCR) mampu mengamplifikasi fragmen DNA sambil mengukur jumlah DNA yang diamplifikasi secara *real time* dengan adanya sinyal fluoresensi (perpendaran) selama proses amplifikasi sehingga memungkinkan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. qPCR menawarkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi serta dapat mendeteksi beberapa patogen secara bersamaan yang penting untuk mengidentifikasi adanya koinfeksi.

Multiplex PCR memungkinkan amplifikasi beberapa fragmen DNA target secara simultan dalam satu tabung reaksi. Metode ini menguntungkan dalam mendeteksi beberapa patogen atau gen resistensi dari sampel yang sama. Pendekatan ini sangat menguntungkan dalam mendiagnosis infeksi pada saluran pernapasan, di mana beberapa virus atau bakteri dapat hidup berdampingan dalam satu sampel pasien yang sama. Kemampuan deteksi yang komprehensif ini memberi dokter informasi berharga tentang koinfeksi dan

pola resistensi antimikroba dalam waktu yang relatif singkat.

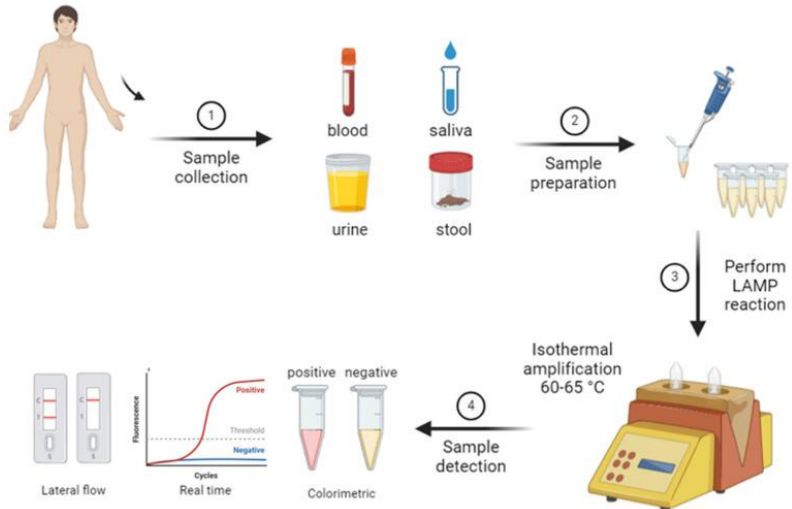
Digital PCR (dPCR) adalah bentuk PCR yang relatif baru dan lebih maju, di mana sampel dipartisi menjadi ribuan reaksi mikro untuk meningkatkan akurasi kuantitatif. dPCR memungkinkan deteksi asam nukleat yang lebih sensitif dan tepat meskipun terdapat dalam jumlah salinan rendah. Oleh karena itu, dPCR digunakan untuk mendeteksi mutasi langka atau patogen tingkat rendah.

2. *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*

Dalam beberapa tahun terakhir, telah dikembangkan metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) untuk mengatasi kekurangan yang dimiliki oleh metode PCR, menyediakan solusi yang lebih cepat, hemat, dan portabel. Metode LAMP ini dapat memperbanyak DNA atau RNA pada suhu konstan secara cepat. Tidak seperti PCR, metode LAMP tidak memerlukan *thermal cycler* karena dilakukan pada kondisi isothermal, artinya pada satu suhu konstan, umumnya antara 60-65 °C.

Prinsip utama dari metode LAMP adalah penggunaan satu set yang terdiri atas empat hingga enam primer untuk mengikat enam hingga delapan daerah berbeda pada urutan DNA target. Set primer dalam LAMP terdiri dari dua primer luar (F3 dan B3), dua primer dalam (*forward inner primer*, FIP, dan

backward inner primer, BIP), dan loop primer opsional (*loop forward*, LF, dan *loop backward*, LB) untuk mempercepat reaksi. Primer dalam memulai amplifikasi dengan melakukan hibridisasi ke daerah tertentu pada DNA target, sementara primer luar memfasilitasi perpindahan untai, melepaskan DNA untai tunggal yang berfungsi sebagai cetakan untuk amplifikasi lebih lanjut. Proses ini menghasilkan pembentukan struktur DNA *stem-loop*, yang penting untuk amplifikasi eksponensial.



Gambar 1.2. Alur Kerja *Loop-Mediated Isothermal Amplification* LAMP (Sumber: Alsharksi *et al.*, 2024)

Komponen utama yang diperlukan untuk reaksi LAMP meliputi nukleotida, *Bst.* DNA polimerase, set primer spesifik, dan buffer reaksi yang mengandung

ion magnesium. Ion magnesium sangat penting untuk aktivitas enzim dan stabilitas struktur DNA yang terbentuk selama amplifikasi. Enzim *Bst*. DNA polymerase berasal dari *Bacillus stearothermophilus*. Enzim ini memiliki kemampuan untuk melepaskan untai DNA tanpa memerlukan siklus termal sehingga proses amplifikasi dapat dilakukan pada kondisi isothermal.

Selama reaksi, amplifikasi DNA target menyebabkan akumulasi produk samping berupa magnesium pirofosfat yang memicu timbulnya kekeruhan di dalam campuran reaksi. Kekeruhan ini dapat diamati dengan mata telanjang, sehingga memungkinkan deteksi visual sederhana terhadap hasil. Selain itu, reaksi LAMP dapat dipantau menggunakan pewarna fluoresensi atau indikator kolorimetri, sehingga memungkinkan pengamatan secara *real time* dan interpretasi hasil yang mudah.

3. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)*

Amplifikasi berbasis urutan asam nukleat (NASBA) beroperasi dalam kondisi isothermal, mengamplifikasi asam nukleat tanpa perlu siklus suhu. NASBA melibatkan konversi RNA menjadi DNA komplementer (cDNA) oleh enzim *reverse transcriptase*, diikuti oleh sintesis RNA dari cetakan cDNA melalui RNA polimerase. RNA yang baru

disintesis kemudian berfungsi sebagai cetakan untuk amplifikasi lebih lanjut dalam siklus NASBA berikutnya.

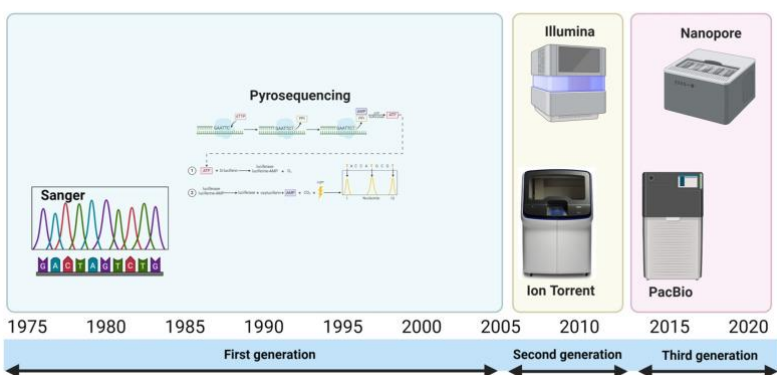
Reaksi NASBA dilakukan pada suhu sekitar 41 °C dan dapat mencapai amplifikasi hingga 10^9 kali lipat dalam waktu 90 menit tanpa memerlukan *thermocycler*. Proses amplifikasi ini bergantung pada tiga jenis enzim yaitu *avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*, T7 RNA polimerase, dan RNase H dan dua buah primer, P1 dan P2. Primer P1 mengandung situs pengikatan untuk T7 RNA polimerase, memfasilitasi sintesis RNA dari hibrid RNA-DNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*. Setelah RNA dikeluarkan dari hibrid, RNase H mendegradasinya, memungkinkan cDNA yang tersisa untuk mengikat primer P2, yang membantu dalam mensintesis untai komplementer. Kehadiran *reverse transcriptase* membuat NASBA sangat efektif untuk amplifikasi RNA.

4. Teknologi *Sequencing*

Kemajuan teknologi sekuensing telah mengubah bidang genomik secara signifikan, memperkenalkan berbagai generasi metode dengan kemampuan dan aplikasi yang berbeda. Teknologi ini secara luas dikategorikan menjadi teknik sekuensing generasi pertama, generasi kedua (sekuensing generasi berikutnya), dan generasi ketiga. Sekuensing Sanger

mewakili generasi pertama dengan akurasi yang tinggi untuk fragmen DNA kecil, sedangkan generasi kedua dan ketiga telah membawa peningkatan substansial dalam hal kecepatan, hasil, dan efektivitas biaya.

Sequencing technologies



Gambar 1.3. Perkembangan Teknologi Sekuensing
(Sumber: Alsharki *et al*, 2024)

Teknologi *Sanger Sequencing*

Pengurutan Sanger menggunakan nukleotida tertentu dengan rantai ujung (nukleotida dideoksi) yang tidak memiliki gugus 3'-OH. Akibatnya, DNA polimerase tidak dapat membentuk ikatan fosfodiester, yang menyebabkan rantai DNA yang sedang tumbuh berakhir pada titik tersebut. ddNTP diberi label fluoresensi atau radioaktif untuk dideteksi dalam perangkat pengurutan otomatis. Pengurutan Sanger tetap menjadi pendekatan

umum untuk mengurutkan sekuens DNA kecil karena menghasilkan sekuens DNA berkualitas tinggi hingga 1000 basa.

Aplikasi utama teknologi sekuensing Sanger mencakup operasi sekuensing reaksi tunggal yang menggunakan primer DNA tertentu yang dipasangkan dengan templat tertentu, yang umumnya digunakan untuk memvalidasi konstruksi plasmid dan produk PCR. Teknik ini bergantung pada produk biologi molekuler berbiaya rendah, seperti reagen dan kit pemurnian DNA, serta primer buatan dengan kualitas tinggi dan aksesibilitas komersial.

Gen 16S rRNA Sequencing

RNA ribosom (rRNA) sangat penting untuk perakitan ribosom yang tepat, enzim yang mensintesis protein seluler. 16S rRNA subunit ribosom kecil dapat digunakan untuk membedakan berbagai kelompok taksonomi. Oleh karena itu, ini menjadi strategi utama untuk mengklasifikasikan bakteri ke dalam kelompok filogenetik dan telah lama digunakan untuk penelitian taksonomi bakteri. Metode ini sangat efektif untuk identifikasi bakteri patogen karena gen 16S rRNA ada di semua spesies bakteri dan sampai saat ini telah menjadi "standar emas" untuk identifikasi bakteri.

Prinsip utama metode ini meliputi primer seleksi gen, amplifikasi PCR dari gen yang dipilih,

sekuensing DNA yang diperkuat, analisis data menggunakan alat bioinformatika, dan analisis komparatif. Penerapan sekuensing gen 16S rRNA memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan teknik konvensional. Analisis sekuens gen 16S rRNA memungkinkan diferensiasi organisme pada tingkat genus di semua filum utama bakteri, serta klasifikasi strain pada beberapa tingkat taksonomi, termasuk spesies dan subspecies yang terkait dengan status kesehatan dan penyakit. Lebih jauh lagi, sequencing 16S rRNA dapat secara khusus berguna dalam mengidentifikasi isolat yang tidak diketahui atau yang memiliki profil biokimia yang ambigu.

Next Generation Sequencing (NGS)

Teknologi sekuensing generasi berikutnya (NGS) telah mengubah wajah genomik dengan menyediakan sekuensing DNA yang cepat, *throughput* yang tinggi dan hemat biaya dibandingkan dengan metode *Sanger sequencing*. Teknologi ini memungkinkan sekuensing secara simultan dari banyak molekul DNA dan RNA sehingga dapat menganalisis materi genetik dalam jumlah besar. Selain menyediakan sekuensing genom yang komprehensif, NGS juga memfasilitasi studi transkriptomik, epigenomik, metagenomik, dan omik lainnya.

Prinsip dasar NGS adalah kemampuannya untuk membaca miliaran urutan basa secara paralel. Teknologi ini memungkinkan analisis materi genetik patogen tertentu serta deteksi berbagai agen infeksius seperti virus, bakteri, dan parasit. Metode ini juga menawarkan efisiensi tinggi dalam mengidentifikasi variasi dan mutasi genetik, dan bahkan menemukan spesies patogen baru.

Salah satu fitur utama yang membedakan NGS dari metode molekuler lainnya adalah kemampuannya untuk menganalisis seluruh mikrobioma dengan satu tes. Namun, implementasi NGS adalah proses yang mahal yang memerlukan banyak infrastruktur teknis, yang membatasi penggunaannya secara luas di laboratorium klinis. Meskipun demikian, pengembangan perangkat NGS portabel dan pengurangan biaya diharapkan dapat membuat teknologi ini lebih mudah diakses dalam waktu dekat.

5. Pendekatan Metagenomik

Salah satu inovasi yang dibawa oleh teknologi NGS adalah penggunaan metagenomik dalam aplikasi klinis. Metagenomik memungkinkan pengurutan semua genom mikroba yang ada dalam sampel lingkungan atau jaringan penyakit, sehingga memungkinkan analisis komunitas mikroba yang kompleks tanpa perlu mendeteksi patogen

individual. Teknik ini sangat berguna untuk mengidentifikasi patogen yang tidak dapat dikulturkan atau tidak dikenal. Metagenomik klinis berfungsi sebagai alat diagnostik penting untuk patogen langka atau agen penyakit yang baru muncul.

Pendekatan metagenomik menawarkan metode skrining yang tidak didorong oleh hipotesis. Hal ini memungkinkan pengurutan dan analisis semua genom mikroba yang ada dalam sampel tanpa pengetahuan sebelumnya tentang penyebab infeksi. Pendekatan semacam itu memberikan keuntungan yang signifikan dalam menyelesaikan infeksi yang kompleks atau tidak diketahui.

Analisis metagenomik adalah salah satu metode yang paling efektif untuk mendiagnosis kondisi seperti meningitis atau sepsis ketika penyebabnya tidak dapat ditentukan. Selain itu, metode ini memainkan peran penting dalam manajemen wabah dan perawatan pasien individu dengan memberikan informasi tentang asal-usul dan jalur penularan penyakit.

6. Metode Diagnostik Berbasis CRISPR

Pendekatan inovatif lainnya adalah metode diagnostik yang didasarkan pada *clustered regular interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) dan teknologi *CRISPR-associated protein* (Cas).

Meskipun teknologi CRISPR-Cas terutama dikenal sebagai alat penyuntingan gen, teknologi ini juga telah berhasil digunakan untuk mendeteksi materi genetik secara spesifik. Metode ini menonjol karena kemampuannya memberikan hasil yang cepat, sensitif, dan spesifik.

Bakteri dan archaea menggunakan sistem CRISPR sebagai sistem imun adaptif untuk mempertahankan diri terhadap plasmid dan virus yang menyerang lingkungannya. Pada dasarnya, sistem CRISPR merupakan bagian penting dari sistem imun mikroba yang menggunakan aktivitas endonuklease yang terhubung dengan enzim Cas untuk menghilangkan patogen invasif setelah mengidentifikasi asam nukleat asing berdasarkan urutannya. Sistem ini bekerja melalui proses dua langkah: akuisisi dan interferensi. Selama akuisisi, fragmen DNA virus diintegrasikan ke dalam genom inang sebagai urutan CRISPR. Setelah infeksi berikutnya, urutan CRISPR ditranskripsi dan diproses menjadi CRISPR RNA (crRNA) yang memandu protein Cas ke urutan virus komplementer, yang mengarah pada pembelahan dan inaktivasi penyerang.

Sistem CRISPR-Cas diklasifikasikan dalam dua kelompok berdasarkan protein Cas. Kelas 1 terdiri dari tipe I (cas3), tipe III (cas10), dan tipe IV (fungsi

tidak diketahui). Sistem CRISPR-Cas Kelas 2 terdiri dari tipe II (Cas9), tipe V (Cas12), dan tipe VI (Cas13). Sementara kelas 1 menggunakan kompleks protein multi-Cas untuk fungsinya, kelas 2 memiliki satu protein efektor. Enzim endonuklease Cas9 dan Cas12 dapat memotong DNA untai ganda (dsDNA), sementara Cas13 menargetkan RNA, tidak seperti Cas9, yang menjadi tidak aktif setelah pembelahan target. Enzim nuklease Cas12 dan Cas13 dapat membelah urutan target dan non-target setelah mereka menargetkan urutan yang diinginkan. Oleh karena itu, enzim ini diaktifkan dan akan mulai memotong terus menerus jika urutan target ada dalam sampel. Cas9, Cas12, Cas13, dan Cas14 adalah enzim yang paling umum digunakan dalam sistem deteksi berbasis CRISPR, yang semuanya termasuk dalam kategori kelas 2. Efektivitas terapi berbasis CRISPR pada dasarnya bergantung pada keamanan dan kinerja protein Cas.

Penerapan teknologi CRISPR/Cas untuk identifikasi patogen menandai peningkatan substansial dalam diagnostik. Identifikasi penyakit menular yang cepat dan akurat memungkinkan intervensi tepat waktu, menurunkan tingkat penularan, dan meningkatkan hasil bagi pasien. Lebih jauh lagi, kemampuan untuk mengidentifikasi infeksi baru dengan cepat dapat meningkatkan

teknik pengawasan dan respons selama wabah, yang pada akhirnya berkontribusi pada inisiatif kesehatan masyarakat global.

E. Jenis Sampel, Penanganan dan *Quality Control* dari Diagnostik Molekuler

1. Jenis Sampel: Darah, Air Liur, Jaringan

Darah (darah utuh, plasma, atau serum), adalah jenis sampel yang paling umum. EDTA adalah antikoagulan yang lebih disukai karena kemampuannya untuk mengkelat kalsium dan menghambat DNase; namun, heparin harus dihindari karena secara signifikan mengganggu reaksi PCR dan aktivitas enzim. Untuk isolasi DNA tumor yang bersirkulasi (ctDNA) atau DNA bebas sel, sangat penting untuk memproses sampel dalam waktu 2-4 jam setelah pengumpulan atau menggunakan tabung penstabil untuk mencegah lisis sel darah putih dan kontaminasi DNA.

Air liur dan usapan (*swab*), merupakan alternatif non-invasif yang menarik. Sampel ini memerlukan media transportasi yang tepat (misalnya, media transportasi virus) dan dapat mencakup agen stabilisasi untuk melindungi integritas RNA yang penting untuk pengujian virus patogen di saluran pernapasan seperti SARS-CoV-2.

Jaringan dan biopsi, termasuk spesimen yang difiksasi dengan formalin di dalam parafin (FFPE), digunakan secara luas dalam onkologi dan diagnostik genetik. Pemrosesan spesimen ini memerlukan pengelolaan mekanis yang kuat, pembalikan ikatan silang pada suhu tinggi, dan pengambilan asam nukleat utuh secara hati-hati

2. Ekstraksi dan Pemurnian Asam Nukleat

Kit kolom putar dan manik magnetik, tetap menjadi standar emas untuk mengekstraksi DNA/RNA dengan kemurnian tinggi pada berbagai jenis sampel, termasuk darah, air liur, dan jaringan; kit ini secara efisien dapat menonaktifkan nuklease dan menghasilkan asam nukleat yang cocok untuk pengujian

Metode ekstraksi cepat, misalnya, lisis panas atau metode kimiawi akan memudahkan penggunaan di tempat perawatan, terutama dalam sistem "*lab-on-a-chip*" mikrofluida dan telepon genggam. Perangkat terintegrasi tersebut dapat mencapai pemurnian asam nukleat yang efektif dalam waktu kurang dari 5 menit, sehingga proses diagnostik berlangsung cepat di lingkungan dengan sumber daya yang terbatas atau di rumah.

Optimasi volume elusi sangat penting. Perangkat otomatis dengan volume elusi yang

tinggi (misalnya, 100 μL) dapat mengencerkan hasil asam nukleat dan mengurangi sensitivitas uji. Sementara sistem mikrofluida menggunakan elusi 5–10 μL mampu mempertahankan konsentrasi dan kinerja deteksi yang tinggi.

3. Kontrol Kualitas: Memastikan Hasil yang Akurat dan Andal

QC pra-analitis melibatkan verifikasi kondisi matriks sampel pemantauan hemolisis, kompatibilitas media transportasi, dan suhu penyimpanan untuk mencegah degradasi atau penghambatan pengujian QC pasca ekstraksi menggunakan spektrofotometri dan fluorometri untuk menilai kemurnian dan konsentrasi. Untuk aplikasi sekuensing, metrik seperti *RNA Integrity Number* (RIN), kualitas perpustakaan, dan tingkat pemetaan baca sangat penting.

Kontrol proses dan pemeriksaan kontaminasi menggabungkan kontrol internal eksogen dan ekstraksi kosong memastikan integritas alur kerja, terutama saat mendeteksi target berkelimpahan rendah.

F. Keunggulan Diagnostik Molekuler

Metode diagnostik molekuler menawarkan keuntungan luar biasa dalam hal kecepatan, sensitivitas, dan spesifisitas, memungkinkan deteksi penyakit yang

lebih cepat, tepat serta memberikan hasil yang lebih baik bagi pasien.

1. Kecepatan: Penyelesaian Cepat untuk Keputusan Penting

Diagnostik molekuler dapat mempersingkat proses pemeriksaan secara drastis dari beberapa hari atau minggu menjadi beberapa menit atau jam:

- 1) PCR dan tes isothermal (misalnya, LAMP, CRISPR) dapat mendeteksi patogen virus seperti SARSCoV2 dalam waktu kurang dari satu jam. Misalnya, pengujian RT-LAMP dan CRISPR memberikan hasil dalam ~30 menit dengan kinerja tinggi setara dengan RT-PCR tetapi tanpa memerlukan thermocycler yang rumit.
- 2) Pada sepsis, uji molekuler cepat (RMA) mengidentifikasi infeksi aliran darah dalam waktu 12 jam, sedangkan metode kultur tradisional seringkali memerlukan waktu berhari-hari
- 3) Sistem Xpert MTB/RIF mendeteksi resistensi TB dan rifampisin dalam waktu kurang dari 2 jam, menggantikan metode kultur tradisional yang memakan waktu berminggu-minggu

Dampak klinis Diagnosis yang lebih cepat memungkinkan intervensi tepat waktu yang penting dalam penanganan sepsis, tuberkulosis, atau COVID-19 sehingga meningkatkan tingkat kelangsungan hidup dan efektivitas pengobatan.

2. Sensitivitas: Mendeteksi Target Tingkat Rendah dan Sulit Dikultur

Pengujian molekular unggul dalam mengidentifikasi patogen dengan kelimpahan rendah dan mutasi langka:

- 1) Sebuah metaanalisis diagnostik infeksi saluran kemih melaporkan sensitivitas 99% untuk PCR dan 90% untuk NGS jauh lebih unggul dibandingkan metode kultur
- 2) Dalam deteksi infeksi aliran darah, tes molekuler mencapai sensitivitas 92–99% dibandingkan dengan kultur konvensional
- 3) PCR digital (dPCR) memungkinkan deteksi mutasi langka bahkan di antara kelebihan DNA tipe liar sebanyak 200.000 kali lipat menunjukkan sensitivitas yang sangat tinggi

Mengapa hal ini penting: Sensitivitas tinggi memastikan infeksi dini atau tingkat rendah terdeteksi dengan andal, mengurangi hasil negatif palsu dan mencegah keterlambatan pengobatan.

3. Spesifisitas: Presisi Tinggi dengan Positif Palsu Minimal

Diagnostik molekular secara andal membedakan sinyal penyakit sebenarnya dari kebisingan latar belakang:

- 1) Metode berbasis PCR untuk SARS-CoV-2 dan infeksi lainnya menunjukkan spesifisitas $\approx 94\text{--}99\%$, sehingga sangat dapat diandalkan
- 2) Pengujian molekuler untuk infeksi aliran darah mencapai spesifisitas $99\text{--}100\%$ untuk deteksi gen resistensi patogen dan antimikroba
- 3) Amplifikasi isothermal gabungan + deteksi CRISPR meningkatkan presisi untuk mengidentifikasi urutan DNA/RNA tertentu menawarkan spesifisitas lapisan ganda

Dampak klinis: Tingkat positif palsu yang rendah mengurangi kesalahan diagnosis dan perawatan yang tidak diperlukan, sehingga menyederhanakan perawatan pasien dan mengurangi biaya perawatan kesehatan.

G. Penerapan Diagnostik Molekuler pada Kasus-Kasus Penyakit

1. Kasus 1: Penyakit Menular – Pneumonia & Patogen Mikroba

Metode PCR multipleks untuk patogen saluran pernapasan kini dapat digunakan untuk mengidentifikasi penyebab pneumonia bakteri dan virus dengan cepat, serta penanda resistensi antimikroba, yang secara signifikan mengungguli kultur. Metode PCR ini menawarkan sensitivitas dan kecepatan yang tinggi, meskipun interpretasi