

RADINKA JOURNAL OF HEALTH SCIENCE

ISSN: 3025-7751

https://www.rjupublisher.com/ojs/index.php/RJHS

Challenges in Sample Preparation, Matrix Effects, and Quality Control in CRISPR-Cas12 Diagnostics: Implications for Medical Laboratory Technology

Maroloan ARUAN[a*], Jessica LAURELIA[b]

[a]*Applied Bachelor's Degree Program in Medical Laboratory Technology, Pelita Harapan University, Tangerang, Indonesia.*
[b]*Bachelor's Degree Program in Biology, Pelita Harapan University, Tangerang, Indonesia.*

*Corresponding author: maroloan.aruan@uph.edu.

Abstract

CRISPR-Cas12-based molecular diagnostics offer attomolar-level sensitivity and high specificity through trans-cleavage activity, presenting a potential, rapid, and affordable alternative for Point-of-Care Testing (POCT). However, the transition to routine clinical service remains hindered by operational challenges across the pre-analytical, analytical, and post-analytical phases. This narrative review aims to evaluate the challenges related to sample preparation, matrix effects, and quality control in CRISPR-Cas12 diagnostics, while examining their implications for the practice of Medical Laboratory Technology. A structured literature search was conducted across four major databases (PubMed, Scopus, DOAJ, and Google Scholar) for open-access publications from 2016–2026, following the SANRA guidelines and the PRISMA 2020 selection flow. The synthesis indicates that extraction-free and one-pot reaction protocols can reduce turnaround time to 30–60 minutes, alleviate the manual pipetting burden on medical laboratory technologists, and minimize the risk of aerosol contamination. Furthermore, interference from biological inhibitors in complex specimens—such as blood, sputum, and urine—can be mitigated by integrating microfluidic partitioning and electrochemical biosensors, without compromising the limit of detection. Testing reliability is further enhanced through the lyophilization of reagents (eliminating reliance on a cold chain), the inclusion of multiplexed internal controls, and the use of calibrated, smartphone-based digital readout systems. The successful clinical implementation of CRISPR-Cas12 diagnostics requires the standardization of a robust, end-to-end workflow suitable for primary healthcare facilities, rather than relying solely on superior analytical performance within a laboratory setting.

Keywords: CRISPR-Cas12; molecular diagnostics; matrix effects; point-of-care testing; quality control.

Tantangan Preparasi Sampel, Efek Matriks, dan Kontrol Kualitas pada Diagnostik CRISPR-Cas12: Implikasi bagi Teknologi Laboratorium Medis

Abstrak

Diagnostik molekuler berbasis CRISPR-Cas12 menawarkan sensitivitas tingkat attomolar dan spesifisitas tinggi melalui aktivitas trans-cleavage, sehingga berpotensi menjadi alternatif Point-of-Care Testing (POCT) yang cepat dan terjangkau. Namun transisi menuju layanan klinis rutin masih terhambat oleh kendala operasional pada tahap pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik. Tinjauan naratif ini bertujuan memancarkan tantangan persiapan sampel, efek matriks, dan kontrol kualitas pada diagnostik CRISPR-Cas12, serta mengkaji penerapannya bagi praktik Teknologi Laboratorium Medis (TLM). Penelusuran literatur dilakukan secara terstruktur pada empat basis data utama (PubMed, Scopus, DOAJ, dan Google Scholar) terhadap publikasi akses terbuka pada rentang tahun 2016–2026 mengacu pada pedoman SANRA dan alur seleksi PRISMA 2020. Hasil sintesis menunjukkan bahwa protokol bebas ekstraksi (extraction-free) dan reaksi satu tabung (one-pot) mampu memangkas waktu tunggu menjadi 30–60 menit, mengurangi beban pemipetan manual Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM), serta meminimalkan risiko kontaminasi aerosol. Selanjutnya, interferensi inhibitor biologi pada spesimen kompleks seperti darah, sputum, dan urin dapat dimitigasi melalui integrasi partisipan mikrofluida dan biosensor elektrokimia tanpa melampaui batas deteksi. Pengujian juga diperkuat melalui liofilisasi reagen untuk memutus ketergantungan pada rantai dingin, penyertaan kontrol internal secara multiplexing, serta pembacaan digital terkalibrasi berbasis smartphone. Keberhasilan penerapan diagnostik klinis CRISPR-Cas12 menuntut standardisasi alur kerja menyeluruh (end-to-end) yang tangguh secara operasional di fasilitas kesehatan primer, tidak hanya mengandalkan keunggulan kinerja analitik di laboratorium.

Kata Kunci: CRISPR-Cas12; diagnostik molekuler; efek matriks; *point-of-care testing*; kontrol kualitas

Ucapan Terima Kasih: Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyiapan artikel ini, dukungan institusional, Universitas Pelita Harapan, serta kepada para pengulas sejawat anonim atas masukan dan saran yang sangat membangun dalam penyempurnaan naskah ini.

Untuk kutipan:
Aruan, M., & Laurelia, J. (2026). Tantangan Preparasi Sampel, Efek Matriks, dan Kontrol Kualitas pada Diagnostik CRISPR-Cas12: Implikasi bagi Teknologi Laboratorium Medis. *Radinka Journal of Health Science*, *4*(2), 756-768.

Pendahuluan

Pengembangan tes genetik dan patogenik telah secara signifikan meningkatkan hasil perawatan kesehatan global. Pengujian asam nukleat, seperti *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR), saat ini menjadi standar emas (*gold standard*) dalam diagnostik molekuler karena sensitivitasnya yang tinggi (Ghouneimy et al., 2023). Meskipun demikian, metode konvensional ini memiliki keterbatasan yang signifikan untuk diterapkan di lapangan atau fasilitas kesehatan dengan sumber daya terbatas, karena membutuhkan peralatan yang mahal, personel yang terlatih khusus, serta waktu tunggu hasil yang relatif lama Untuk merespons ancaman kesehatan masyarakat seperti wabah penyakit infeksi, terdapat kebutuhan mendesak akan solusi diagnostik *point-of-care* (POC) yang terdesentralisasi, cepat, dan akurat (Ahamed et al., 2025); (Quintela et al., 2022).

Dalam beberapa tahun terakhir, sistem *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) dan protein terkait CRISPR (Cas) telah bertransformasi dari mekanisme pertahanan imun adaptif bakteri menjadi alat diagnostik molekuler generasi baru (J. Li et al., 2024). CRISPR-Cas12 menarik perhatian karena dapat menargetkan dsDNA maupun ssDNA dengan spesifisitas tinggi (A. T. Lee et al., 2025). Setelah *CRISPR RNA* (crRNA) mengenali dan berikatan dengan sekuens target yang spesifik, protein Cas12 teraktivasi dan memicu aktivitas *trans-cleavage* (pemotongan kolateral), yaitu pemotongan acak terhadap molekul pelapor (*reporter*) ssDNA di sekitarnya untuk menghasilkan sinyal fluoresensi atau kolorimetri yang dapat dideteksi (Aborode et al., 2025). Kemampuan ini telah melahirkan berbagai platform diagnostik inovatif seperti DETECTR (*DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*) dan HOLMES (*One-HOur Low-cost Multipurpose highly Efficient System*) yang menawarkan sensitivitas sangat tinggi dengan biaya yang lebih terjangkau (Z. Pan et al., 2026b).

Meskipun penggabungan CRISPR dengan teknik amplifikasi isotermal (seperti RPA atau LAMP) mampu mencapai sensitivitas tingkat attomolar di lingkungan laboratorium yang terkontrol (Z. Pan et al., 2026a), transisi teknologi ini ke aplikasi POC di dunia nyata masih menghadapi hambatan operasional dan ekologis yang krusial (Wang et al., 2025a). Agar diagnostik CRISPR dapat memenuhi kriteria ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid, Equipment-free, and Deliverable*) dari WHO, inovasi tidak boleh hanya berfokus pada optimalisasi teknis analitik, tetapi harus beradaptasi dengan realitas kondisi spesimen dan rutinitas di laboratorium klinik (T. Li et al., 2023). Dalam praktik Teknologi Laboratorium Medis, preparasi sampel dan efek matriks merupakan dua tantangan utama penerapan CRISPR-Cas12 secara klinis. Protokol pemrosesan sampel saat ini sering kali masih panjang dan membebani alur kerja laboratorium (Myke-Mbata et al., 2026); (Shao et al., 2026). Selain itu, spesimen klinis seperti darah, sputum, dan urine memiliki matriks kompleks yang mengandung berbagai inhibitor biologis. Komponen-komponen biologis ini dapat mengganggu efisiensi amplifikasi asam nukleat dan secara langsung menghambat aktivitas enzim Cas, sehingga memicu hasil negatif palsu (*false-negative*) (Cherie et al., 2024); (Q. Li & Plebani, 2026). Walaupun pengenceran sampel (*sample dilution*) sering digunakan oleh Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) untuk meminimalkan efek inhibitor ini, pendekatan tersebut pada akhirnya dapat mengorbankan tingkat sensitivitas deteksi.

Di samping itu, kontrol kualitas dan standardisasi protokol menjadi prasyarat mutlak untuk memastikan keandalan diagnostik CRISPR sebelum diterapkan secara luas (Zhou et al., 2025b); (Y. Pan et al., 2026). Sistem ini rentan terhadap risiko positif palsu (*false-positive*) yang disebabkan oleh aktivitas *off-target*, serta kontaminasi silang antar-sampel atau paparan aerosol saat memindahkan cairan dalam metode reaksi terpisah (*two-pot*) (Khurshid et al., 2024). Penerapan di daerah dengan sumber daya terbatas juga terhambat oleh kebutuhan reagen yang stabil tanpa rantai dingin (*cold chain*). Oleh karena itu, diperlukan strategi integrasi reaksi dalam satu tabung (*one-pot*), penggunaan teknologi mikrofluida, hingga teknik liofilisasi (pengeringan beku) untuk memitigasi kendala-kendala tersebut (Zhou et al., 2025a).

Oleh karena itu, tinjauan naratif ini bertujuan untuk mengevaluasi tantangan operasional preparasi sampel, efek matriks, dan kontrol kualitas pada diagnostik molekuler berbasis CRISPR-Cas12, serta secara khusus mengkaji implikasinya bagi bidang Teknologi Laboratorium Medis. Pemahaman dan resolusi terhadap faktor-faktor ini sangat penting untuk menjembatani kesenjangan antara riset laboratorium dan aplikasi POC, sekaligus memandu praktisi laboratorium dalam mengadopsi sistem deteksi penyakit infeksi yang tangguh, akurat, dan terstandardisasi.

Metodologi

Artikel ini merupakan tinjauan naratif yang disusun melalui penelusuran literatur secara terstruktur untuk mengurangi bias pemilihan studi (Snyder, 2019). Evaluasi kualitas artikel yang dilibatkan dalam tinjauan ini mengacu pada pedoman *Scale for the Assessment of Narrative Review Articles* (SANRA) untuk memastikan penyajian data yang objektif dan komprehensif (Baethge et al., 2019). Data yang diekstraksi berfokus pada tiga aspek: preparasi sampel, efek matriks, dan kontrol kualitas.

Pencarian literatur dilakukan secara sistematis melalui empat basis data elektronik utama, yaitu PubMed/MEDLINE, Scopus, *Directory of Open Access Journals* (DOAJ), dan Google Scholar. Kata kunci pencarian dirumuskan menggunakan kombinasi operator Boolean sebagai berikut: *("CRISPR-Cas12" OR "DETECTR") AND ("sample preparation" OR "extraction" OR "amplification") AND ("matrix effect" OR "clinical sample" OR "inhibitor") AND ("quality control" OR "standardization")*.

Kriteria inklusi yang diterapkan dalam pemilihan studi meliputi: (1) artikel diterbitkan dalam rentang waktu 10 tahun terakhir (2016–2026); (2) tersedia secara utuh sebagai artikel akses terbuka (*open access*); (3) ditulis dalam bahasa Inggris atau bahasa Indonesia; dan (4) merupakan artikel penelitian primer atau ulasan yang secara eksplisit mengevaluasi parameter analitik dan operasional klinis dari diagnostik molekuler CRISPR-Cas12. Sebaliknya, kriteria eksklusi mencakup: (1) literatur yang hanya tersedia dalam format abstrak; (2) opini, editorial, atau surat kepada editor; (3) pemodelan *in-silico* tanpa validasi laboratorium (*wet lab*); serta (4) studi yang berfokus secara eksklusif pada aplikasi terapi pengeditan gen (*gene editing*) tanpa melibatkan aspek diagnostik.

Proses identifikasi, penyaringan judul dan abstrak, hingga penyeleksian teks lengkap didokumentasikan mengikuti alur pedoman *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) 2020 (Page et al., 2021) sebagaimana diilustrasikan pada diagram alir (Gambar 1). Proses ekstraksi data dari literatur yang terpilih mencakup identifikasi jenis spesimen klinis yang diuji, variasi metode ekstraksi atau pra-amplifikasi isotermal, jenis inhibitor matriks yang ditemukan, batas deteksi (*Limit of Detection*/LoD), serta metode stabilisasi reagen dan penerapan kontrol kualitas internal.

Hasil dan Diskusi

Penerapan diagnostik CRISPR-Cas12 di layanan klinis tidak hanya ditentukan oleh kinerja analitik, tetapi juga oleh keandalan seluruh alur kerja sebelum, selama, dan setelah pemeriksaan. Meskipun aktivitas *trans-cleavage* Cas12 menawarkan sensitivitas tingkat attomolar ketika dikombinasikan dengan amplifikasi isotermal, performa analitik yang tinggi di laboratorium terkontrol sering kali mengalami penurunan signifikan saat dihadapkan pada sampel klinis dunia nyata dan keterbatasan infrastruktur. Ringkasan temuan mengenai tantangan operasional, inovasi mitigasi teknis, serta implikasinya terhadap praktik Teknologi Laboratorium Medis (TLM) disajikan pada Tabel 1.

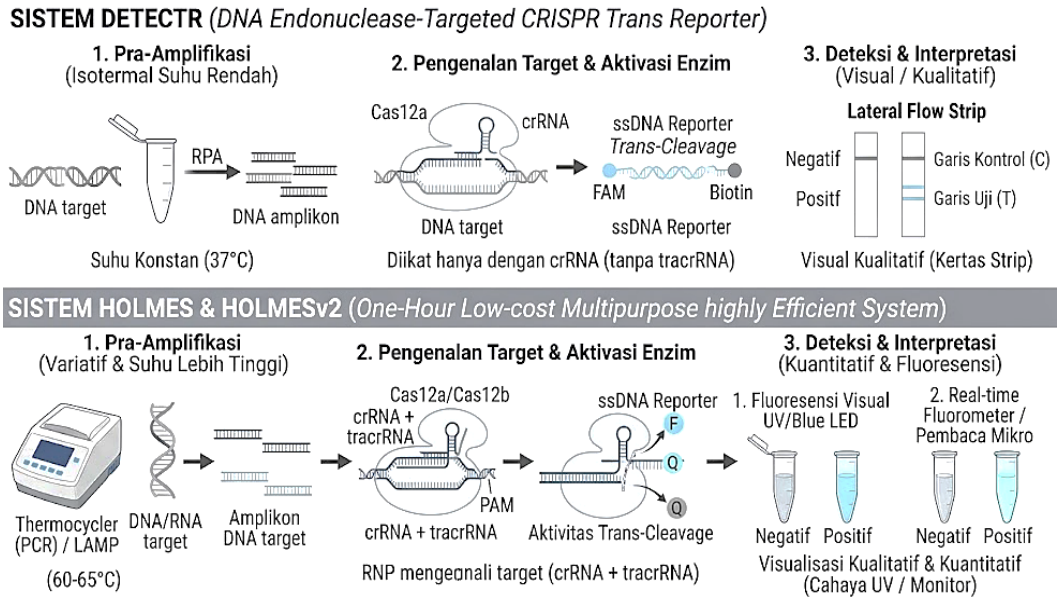
Tabel 1. Sintesis Tantangan Operasional, Strategi Mitigasi, dan Implikasi Laboratorium Medis pada Diagnostik CRISPR-Cas12

Parameter Operasional	Kendala Utama Klinis	Strategi Mitigasi dan Inovasi	Implikasi pada Teknologi Laboratorium Medis (TLM)

Preparasi Sampel	Ekstraksi multi-tahap yang lama, butuh instrumen khusus, dan risiko kontaminasi silang pada sistem dua pot.	Lisis termal/kimiawi bebas ekstraksi (bebas ekstraksi), sistem satu pot dengan pemisah fase (gel agarosa/lilin), rekayasa gRNA dengan PAM suboptimal, dan enzim termostabil AapCas12b (Hervás-Pérez et al., 2026)	Memangkas waktu tunggu hasil (turnaround time) menjadi 30–60 menit, mengurangi beban kerja pemipetan manual oleh Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM), dan menekan risiko paparan biologi (biosafety)
Efek Matriks (*Matrix Effects*)	Inhibisi amplifikasi dan aktivitas enzim Cas12 oleh hemoglobin, musin, mukopolisakarida, serta imunoglobulin yang memicu negatif palsu	Pengenceran sampel pengukuran, partisi droplet mikrofluida (CRISPR-on-Chip), ekstraksi magnetic bead otomatis pada chip sentrifugal, dan biosensor elektrokimia	Meningkatkan toleransi pengujian terhadap variasi spesimen pasien (darah utuh, sputum, urine, saliva) tanpa ketergantungan mutlak pada instrumen ekstraksi otomatis yang mahal (Huang et al., 2023a)
Kontrol Kualitas (*Quality Control*)	Positif palsu akibat efek *off-target* atau aerosol amplikon, degradasi reagen cair tanpa rantai dingin, serta subjektivitas pembacaan visual *lateral flow*	Integrasi kontrol internal (*multiplexing* ortogonal), liofilisasi reagen (*freeze-drying*), desain crRNA berbasis kecerdasan buatan (AI), dan pembacaan kuantitatif via *smartphone.*	Memenuhi standar Pemantapan Mutu Internal (PMI), mencegah kesalahan pelaporan hasil kritis, menstandardisasi konsistensi antar-laboratorium (*lot-to-lot*), dan memfasilitasi distribusi reagen ke fasilitas kesehatan primer.

Evolusi Preparasi Sampel dan Integrasi Reaksi Satu Tabung (One-Pot)

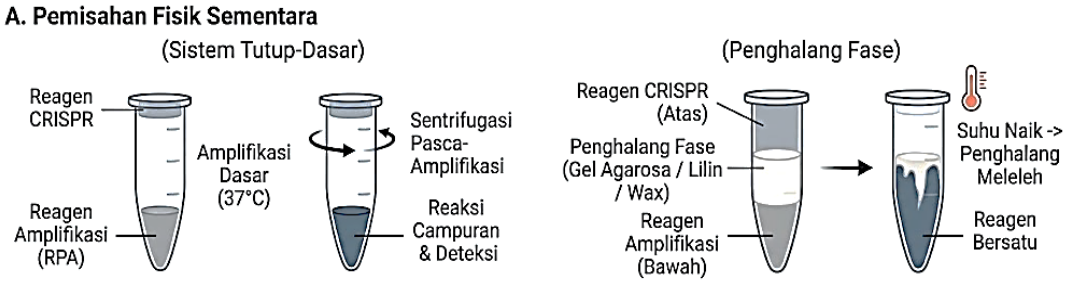
Tahap pra-analitik, khususnya ekstraksi dan pemurnian asam nukleat, merupakan hambatan utama (*bottleneck*) dalam mewujudkan sistem diagnostik *"sample-in-result-out"* yang practical. Tanpa pra-amplifikasi, laju katalitik trans-cleavage enzim Cas12 yang relatif rendah membatasi batas deteksi (*Limit of Detection*/LoD) hanya pada kisaran pikomolar (pM), sehingga tidak cukup sensitif untuk mendeteksi patogen dengan beban (*titer*) rendah pada fase awal infeksi. Oleh karena itu, sistem seperti DETECTR dan HOLMES mengintegrasikan Cas12 dengan amplifikasi isotermal seperti Recombinase Polymerase Amplification (RPA) atau Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) yang bekerja pada suhu konstan tanpa memerlukan kompleks thermocycler.



Gambar 1. Perbedaan mekanisme dan sistem DETECTR dan HOLMES

Meskipun demikian, pengoperasian amplifikasi isotermal dan deteksi Cas12 secara berurutan dalam dua tabung terpisah (*two-pot*) mengharuskan pembukaan tutup tabung untuk pemindahan amplikon, yang secara drastis meningkatkan risiko kontaminasi silang aerosol dan memperumit prosedur kerja. Sebaliknya, ketika kedua reaksi digabungkan langsung ke dalam satu tabung (*one-pot*), muncul masalah inkompatibilitas biokimia dan kompetisi kinetik: enzim Cas12 yang teraktivasi lebih awal akan memotong habis (*deplete*) cetakan DNA target sebelum proses amplifikasi eksponensial selesai, sehingga menurunkan sensitivitas pengujian secara keseluruhan. Beberapa strategi telah dikembangkan untuk mengatasi kendala tersebut:

Pemisahan Fisik Sementara yaitu menempatkan reagen CRISPR pada tutup tabung dan reagen amplifikasi di dasar tabung yang disatukan melalui sentrifugasi pasca-amplifikasi, atau menggunakan penghalang fase seperti antarmuka gel agarosa dan penghalang lilin (*wax barrier*) yang meleleh pada suhu tertentu (Qiu et al., 2022); (Bogiel et al., 2024).



Gambar 2. Sistem Pemisahan Fisik Sementara

Modulasi kinetika reaksi dengan merancang sekuens *guide RNA* (gRNA) yang menargetkan situs *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) suboptimal untuk memperlambat laju pemotongan Cas12 di awal reaksi, sehingga memberi waktu bagi RPA untuk memperbanyak target secara memadai (Huang et al., 2023b); (S. M. Lee et al., 2023); Pemanfaatan Varian Enzim Termostabil yaitu mengganti Cas12a konvensional dengan varian tahan panas seperti AapCas12b

(dari *Alicyclobacillus acidiphilus*) yang tetap aktif pada suhu 60–65°C, sehingga kompatibel sepenuhnya dengan suhu reaksi RT-LAMP dalam format satu tabung seperti pada platform *CRISPR-one* (Zhao et al., 2022)*;* (Yuan et al., 2021). Dalam praktik TLM, metode bebas ekstraksi dapat menyederhanakan preparasi sampel dan mengurangi langkah manual yang berisiko menimbulkan kesalahan. Inovasi *one-pot* dan extraction-free ini tidak hanya memangkas waktu pemeriksaan (*turnaround time*) menjadi 30 hingga 60 menit, tetapi juga meminimalkan intervensi pemipetan manual oleh Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM). Dalam tata kelola laboratorium klinik, pengurangan langkah manipulasi cairan secara langsung menurunkan potensi human error pada tahap pra-analitik sekaligus meningkatkan keselamatan hayati (*biosafety*) petugas laboratorium saat menangani spesimen infeksius berisiko tinggi.

Tantangan dan Mitigasi Efek Matriks Spesimen Klinis (Matrix Effects)

Validasi analitik yang sukses menggunakan asam nukleat murni atau sampel sintetis sering kali gagal direplikasi pada spesimen klinis karena adanya interferensi efek matriks. Spesimen biologis manusia seperti darah utuh, sputum, usap nasofaring, urine, dan feses merupakan matriks kompleks yang kaya akan inhibitor endogen. Keberadaan hemoglobin dan imunoglobulin dalam darah, serta musin dan mukopolisakarida yang memberikan viskositas tinggi pada sputum atau saliva, terbukti menghambat kerja enzim polimerase pada tahap pra-amplifikasi sekaligus mengganggu pembentukan kompleks ribonukleoprotein (RNP) Cas12 serta menurunkan efisiensi trans-cleavage. Selain itu, nuklease endogen yang terdapat dalam cairan tubuh dapat mendegradasi crRNA maupun molekul pelapor (reporter), yang secara kolektif memicu terjadinya hasil negatif palsu (*false-negative*). Dalam praktik laboratorium rutin, pendekatan paling sederhana untuk meminimalkan efek inhibitor dan interaksi non-spesifik dari sampel mentah adalah melakukan pengenceran sampel (*sample dilution*) ke dalam buffer reaksi CRISPR. Namun, pengenceran sampel juga menurunkan jumlah target asam nukleat sehingga berpotensi mengurangi sensitivitas dibandingkan ekstraksi yang lebih murni.

Untuk mengatasi efek matriks tanpa mengorbankan sensitivitas, integrasi teknologi mikrofluida (*CRISPR-on-Chip*) dan rekayasa transduksi sinyal menjadi solusi krusial: Partisi Mikrofluida dan Otomatisasi Ekstraksi dengan penggunaan *chip* mikrofluida sentrifugal yang mengintegrasikan ekstraksi *magnetic bead* terpaket mampu memproses hingga 48 sampel secara otomatis dalam 15–60 menit pada suhu 60°C, memisahkan asam nukleat dari matriks inhibitorik dalam sistem tertutup. Selain itu, partisi sampel ke dalam ribuan *droplet* berukuran mikro (*digital CRISPR*) mampu mengonsentrasikan molekul target tunggal dalam volume kecil, meningkatkan efisiensi tumbukan enzim, dan mengisolasi molekul inhibitor ke dalam kompartemen terpisah; Transduksi Sinyal Bebas Optik: Kekeruhan (*turbidity*) dan autofluoresensi dari matriks sampel klinis seperti darah atau serum sering kali mengganggu pembacaan sinyal optik/fluoresensi. Penggabungan sistem CRISPR-Cas12 dengan biosensor elektrokimia (seperti E-CRISPR) atau *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS) menawarkan rasio sinyal-terhadap-derau (*signal-to-noise ratio*) yang tinggi dan tidak terpengaruh oleh kekeruhan warna sampel, sehingga memungkinkan deteksi langsung pada matriks serum atau cairan biologis yang pekat (Hang et al., 2022). Bagi bidang TLM, kemajuan mitigasi efek matriks ini memperluas spektrum jenis spesimen yang dapat diterima oleh laboratorium tanpa harus selalu bergantung pada sentrifugasi kecepatan tinggi atau pemurnian kolom silika yang memakan waktu. Namun, evaluasi menyeluruh tetap harus dilakukan oleh ATLM untuk memastikan bahwa protokol lisis langsung (*direct-to-amplification*) benar-benar memiliki toleransi inhibitor yang tervalidasi pada berbagai tingkat keparahan penyakit pasien.

Strategi Kontrol Kualitas (Quality Control), Stabilitas Reagen, dan Standardisasi

Sensitivitas yang tinggi saja belum cukup; hasil pemeriksaan tetap perlu didukung oleh Pemantapan Mutu Internal yang baik agar presisi dan akurasi dapat terjaga. Tantangan kualitas terbesar pada diagnostik berbasis CRISPR-Cas12 mencakup pengendalian positif palsu, pencegahan negatif palsu, stabilitas penyimpanan reagen, serta standardisasi interpretasi hasil. Secara mekanistik, Cas12 sebenarnya menawarkan lapisan kontrol spesifisitas tambahan terhadap amplifikasi non-spesifik yang sering terjadi pada metode isotermal (LAMP/RPA), karena aktivasi pemotongan Cas12 mensyaratkan tiga pengikatan spesifik sekaligus: interaksi crRNA-Cas, hibridisasi crRNA-target, dan pengenalan sekuens PAM oleh enzim Cas. Namun, toleransi terhadap ketidakcocokan basa (*mismatch tolerance*) dan efek off-target tetap dapat memicu pemotongan kolateral yang menghasilkan positif palsu. Risiko ini juga diperparah oleh desain sistem autocatalytic (umpan balik positif tanpa amplifikasi) yang dapat memicu amplifikasi sinyal tak terkendali (*runaway signal amplification*) jika terjadi pemotongan non-spesifik sekecil apa pun. Sebagai langkah kendali mutu molekuler, penggunaan *dual synthetic mismatch* (dsmCRISPR), sistem AIOD-CRISPR yang memanfaatkan situs PAM ganda, serta pemanfaatan algoritma *Artificial Intelligence* (AI) dan *Deep Learning* (DL) untuk memprediksi efisiensi dan meminimalkan *off-target* gRNA telah berhasil meningkatkan spesifisitas pengujian secara signifikan (Khoshandam et al., 2024); (M. Lee, 2023).

Untuk mencegah pelaporan negatif palsu akibat kegagalan ekstraksi, degradasi reagen, atau inhibisi matriks, penyertaan kontrol internal (*internal control*) (seperti kontrol proses eksternal dan penanda kecukupan spesimen (*specimen-adequacy marker*)) merupakan syarat mutlak. Tantangan teknis dalam melakukan *multiplexing* (mendeteksi gen patogen dan gen kontrol internal secara bersamaan dalam satu tabung) pada sistem Cas12 adalah sifat *trans-cleavage* yang tidak spesifik, yang dapat memicu *signal crosstalk* dengan memotong seluruh probe pelapor yang ada di dalam tabung. Hal ini diatasi melalui: Penggunaan sistem CRISPR ortogonal dalam satu reaksi (misalnya menggabungkan Cas12a yang memotong reporter ssDNA dan Cas13a yang memotong reporter ssRNA secara spesifik);Pemisahan spasial menggunakan *array* mikrofluida atau modulasi presisi rasio konsentrasi crRNA untuk menekan interferensi sinyal antar-target.

Aspek krusial lainnya dalam manajemen mutu laboratorium adalah stabilitas reagen dan konsistensi antar-bets (*batch-to-batch / lot-to-lot variability*). Enzim Cas dan molekul crRNA dalam fase cair sangat rentan terhadap degradasi fisik maupun kimiawi, serta membutuhkan rantai dingin (*cold chain*) pada suhu ultra-rendah yang menyulitkan distribusi ke daerah terpencil (Luo et al., 2023). Bahkan, studi lapangan menunjukkan bahwa kelembapan tinggi di lingkungan non-ideal dapat menurunkan performa pengujian berbasis CRISPR hingga 63% (Wang et al., 2025b). Selain itu, pemodelan matematis membuktikan bahwa fluktuasi kecil pada konsentrasi enzim atau komposisi buffer akibat pemipetan manual dari reagen cair dapat menghasilkan variasi sinyal yang signifikan antar-laboratorium (Kemmer et al., 2024). Liofilisasi reagen dapat mengurangi ketergantungan pada rantai dingin serta menyederhanakan langkah pencampuran, sehingga membantu menurunkan risiko kesalahan pemipetan.

Pada tahap pasca-analitik (pembacaan dan pelaporan hasil), metode berbasis *Lateral Flow Assay* (LFA) sangat diminati untuk aplikasi *Point-of-Care Testing* (POCT) karena kemudahan visualisasinya menggunakan konjugat nanopartikel emas (AuNP) dan reporter FAM-biotin (Guo et al., 2026). Namun, LFA memiliki keterbatasan kontrol kualitas yang mendasar: hasilnya bersifat kualitatif dan sangat rentan terhadap bias interpretasi subjektif antar-pengguna akibat variasi intensitas pita pada garis uji (*Test line*) ketika konsentrasi target berada di dekat batas deteksi. Selain itu, berbeda dengan RT-qPCR yang memberikan nilai kuantitatif *viral load* melalui kurva siklus ambang (*threshold cycle*), sebagian besar uji CRISPR konvensional belum terkalibrasi secara kuantitatif (Z. Li et al., 2020). Untuk menstandardisasi tahap pasca-analitik ini, integrasi detektor fluoresensi atau kolorimetri berbasis kamera *smartphone* yang dilengkapi algoritma

Machine Learning (ML) telah diterapkan. Sistem pembacaan pintar ini mampu mendeteksi perubahan sinyal fluoresensi sekecil 1% dalam wadah tertutup tanpa perlu membuka tutup tabung (mencegah kontaminasi aerosol), menghilangkan subjektivitas pembacaan mata telanjang, serta memfasilitasi pelaporan data terkalibrasi secara real-time ke sistem informasi laboratorium atau pusat surveilans kesehatan masyarakat.

Implikasi Translasi Klinis dan Regulasi dalam Laboratorium Medis

Kesenjangan antara inovasi akademik dan adopsi klinis (yang sering disebut sebagai "*valley of death*" dalam translasi teknologi diagnostik) menunjukkan bahwa keunggulan analitik semata tidak cukup untuk menggeser dominasi qPCR di laboratorium klinik. Hingga saat ini, sebagian besar platform diagnostik CRISPR yang memperoleh otorisasi regulasi (seperti *Emergency Use Authorization* dari FDA untuk SARS-CoV-2 atau sertifikasi CE-IVD untuk *genotyping* HPV) masih dibatasi penggunaannya pada laboratorium tersertifikasi *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) yang memiliki personel terlatih dan infrastruktur memadai (Hensley et al., 2024). Hal ini disebabkan oleh belum adanya harmonisasi standar kinerja internasional, ketiadaan material referensi standar, serta kurangnya data validasi klinis multisenter berskala besar yang mengevaluasi konsistensi pengujian pada populasi pasien yang beragam (Christiansen et al., 2025).

Bagi praktisi Teknologi Laboratorium Medis, temuan ini menegaskan bahwa integrasi diagnostik berbasis CRISPR-Cas12 ke dalam alur kerja laboratorium rutin maupun POCT menuntut pendekatan sistemik yang menyeluruh (*end-to-end workflow*). Keberhasilan implementasi teknologi ini bergantung pada penyatuan protokol preparasi sampel yang tahan terhadap inhibitor matriks, pemanfaatan reagen terliofilisasi yang terstandardisasi, serta penerapan kontrol kualitas internal dan pembacaan digital yang terkalibrasi. Selain itu, dalam konteks klinis seperti deteksi gen resistensi antimikroba (AMR), ATLM dan klinisi harus tetap menempatkan uji genotipik CRISPR sebagai alat skrining cepat yang komplementer terhadap uji konfirmasi fenotipik (kultur dan uji kepekaan antibiotik) guna memastikan ketepatan terapi pasien (Anderson et al., 2022). Dengan menjembatani aspek preparasi sampel, toleransi matriks, dan kendali mutu sesuai kerangka regulasi alat kesehatan in vitro (seperti standar FDA 21 CFR Part 801 dan kriteria ASSURED WHO), diagnostik molekuler CRISPR-Cas12 dapat bertransformasi menjadi instrumen diagnostik yang andal, terjangkau (2-5 per tes), dan merata bagi sistem pelayanan kesehatan global.

Kesimpulan

Diagnostik molekuler berbasis CRISPR-Cas12 memiliki potensi besar sebagai metode deteksi infeksi yang cepat, sensitif, dan spesifik pada tingkat nukleotida untuk mendukung *Point-of-Care Testing* (POCT), namun penerapannya di fasilitas kesehatan masih menghadapi hambatan operasional klinis yang nyata. Tinjauan naratif ini bertujuan mengevaluasi tantangan preparasi sampel, efek matriks, dan kontrol kualitas pada diagnostik CRISPR-Cas12 serta mengkaji implikasinya bagi praktik Teknologi Laboratorium Medis (TLM). Hasil sintesis literatur menunjukkan bahwa pendekatan bebas ekstraksi (*extraction-free*) dan integrasi reaksi satu tabung (*one-pot*) mampu mempercepat waktu tunggu hasil menjadi 30–60 menit serta menekan risiko kontaminasi aerosol, sementara mikrofluida dan biosensor elektrokimia membantu memitigasi inhibisi matriks biologis tanpa mengorbankan sensitivitas, serta liofilisasi reagen, kontrol internal *multiplexing*, dan pembacaan digital memperkuat keandalan pengujian. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa transisi CRISPR-Cas12 menuju POCT yang ideal menuntut standardisasi alur kerja menyeluruh (*end-to-end*) yang tangguh secara operasional dan sesuai kriteria ASSURED,

bukan sekadar mengandalkan keunggulan sensitivitas analitik semata. Temuan ini berimplikasi pada perlunya penyesuaian alur kerja pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik oleh Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) agar tetap selaras dengan Pemantapan Mutu Internal (PMI), kerangka regulasi alat diagnostik *in vitro*, serta pengujian konfirmasi klinis seperti uji fenotipik pada resistensi antimikroba (AMR). Meskipun demikian, tinjauan ini memiliki keterbatasan karena berfokus pada sintesis naratif literatur akses terbuka (2016–2026) yang mengacu pada pedoman SANRA dan PRISMA 2020 tanpa melakukan analisis kuantitatif meta-analisis maupun validasi eksperimental langsung, serta mencerminkan kondisi regulasi dan ketersediaan data validasi multisenter yang masih berkembang. Oleh karena itu, penelitian masa depan perlu diarahkan pada validasi klinis multisenter berskala besar pada beragam spesimen pasien, penyusunan material referensi dan standar kinerja internasional, pengembangan uji kuantitatif yang terkalibrasi, serta optimalisasi stabilitas reagen terliofilisasi dan integrasi pembacaan digital cerdas untuk layanan kesehatan primer.

Konflik kepentingan

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

Kontribusi penulis

Maroloan Aruan: Konseptualisasi, metodologi, penyediaan sumber daya, kurasi data, validasi, penulisan – penyusunan draf awal, penulisan – peninjauan dan penyuntingan, serta visualisasi. **Jessica Laurelia:** Konseptualisasi, metodologi, investigasi, analisis formal, validasi, penulisan – penyusunan draf awal, penulisan – peninjauan dan penyuntingan, serta visualisasi. Seluruh penulis telah membaca dan menyetujui versi akhir naskah untuk dipublikasikan.

Pendanaan

Penelitian ini tidak menerima pendanaan eksternal apa pun.

Deklarasi Penggunaan AI Generatif dalam Penulisan Ilmiah

Selama penyusunan karya tulis ini, penulis menggunakan Grammarly untuk menyempurnakan bahasa, menerjemahkan teks, dan menyunting abstrak agar lebih jelas. Setelah menggunakan perangkat/layanan tersebut, penulis meninjau dan menyunting konten sesuai kebutuhan serta bertanggung jawab penuh atas isi publikasi ini.

Referensi

Aborode, A. T., Adesola, R. O., Scott, G. Y., Arthur-Hayford, E., Otorkpa, O. J., Kwaku, S. D., Elebesunu, E. E., Nibokun, E. O., Aruorivwooghene, I. J., Bakre, A. A., Ogundijo, O. A., Banwo, O. G., Ige, O., Adelakun, I. O., Onifade, I. A., Ogungbemi, S. E., Dosunmu, B. T., Ayando, O. D., Idowu, N., … Jimoh, O. O. (2025). Bringing lab to the field: Exploring innovations in point-of-care diagnostics for the rapid detection and management of tropical diseases in resource-limited settings. *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, *7*, 28–43. https://doi.org/10.1016/j.abst.2025.01.001

Ahamed, A., Politza, A. J., Liu, T., Asad, M., Khalid, U., Zhang, H., & Guan, W. (2025). CRISPR-based strategies for sample-to-answer monkeypox detection: Current status and emerging opportunities. *Nanotechnology*, *36*. https://doi.org/10.1088/1361-6528/ad892b

Anderson, C. E., Huynh, T., Gasperino, D. J., Alonzo, L. F., Cantera, J. L., Harston, S. P., Hsieh, H. V., Marzan, R., McGuire, S. K., Williford, J. R., Oncina, C. I., Glukhova, V. A., Bishop, J. D., Cate, D. M., Grant, B. D., Nichols, K. P., & Weigl, B. H. (2022). Automated liquid handling robot for rapid lateral flow assay development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *414*(8), 2607–2618. https://doi.org/10.1007/s00216-022-03897-9

Baethge, C., Goldbeck-wood, S., & Mertens, S. (2019). SANRA — a scale for the quality assessment of narrative review articles. *Research Integrity and Peer Review*, *8*, 2–8.

Bogiel, T., Kwiecińska, P., Górniak, R., Kanarek, P., & Mikucka, A. (2024). The Use of Gel Electrophoresis to Separate Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplicons Allows for the Easy Identification and Assessment of the Spread of Toxigenic Clostridioides difficile Strains. *Gels*, *10*(12), 818. https://doi.org/10.3390/gels10120818

Cherie, N., Berta, D. M., Tamir, M., Yiheyis, Z., Angelo, A. A., Mekuanint Tarekegn, A., Chane, E., Nigus, M., & Teketelew, B. B. (2024). Improving laboratory turnaround times in clinical settings: A systematic review of the impact of lean methodology application. *PLOS ONE*, *19*(10), e0312033. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312033

Christiansen, F., Konuk, E., Ganeshan, A. R., Welch, R., Palés Huix, J., Czekierdowski, A., Leone, F. P. G., Haak, L. A., Fruscio, R., Gaurilcikas, A., Franchi, D., Fischerova, D., Mor, E., Savelli, L., Pascual, M. À., Kudla, M. J., Guerriero, S., Buonomo, F., Liuba, K., … Epstein, E. (2025). International multicenter validation of AI-driven ultrasound detection of ovarian cancer. *Nature Medicine*, *31*(1), 189–196. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03329-4

Ghouneimy, A., Mahas, A., Marsic, T., Aman, R., & Mahfouz, M. (2023). CRISPR-Based Diagnostics: Challenges and Potential Solutions toward Point-of-Care Applications. *ACS Synthetic Biology*, *12*(1), 1–16. https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00496

Guo, A., Bell, A. G., & Myhrvold, C. (2026). Towards deployable CRISPR-based nucleic acid detection RECEIVED. *Prog. Biomed. Eng.*, *8*. https://doi.org/10.1088/2516-1091/ae6e0b

Hang, Y., Boryczka, J., & Wu, N. (2022). Visible-light and near-infrared fluorescence and surface-enhanced Raman scattering point-of-care sensing and bio-imaging: A review. *Chemical Society Reviews*, *51*(1), 329–375. https://doi.org/10.1039/C9CS00621D

Hensley, L. E., Klena, J. D., DeBoer, J. T., Montgomery, J. M., Mbala, P., Moses, M. E., Knapek, K. J., & Olinger, G. G. (2024). 9 Laboratory Needs for Research Response. In R. A. Sorenson (Ed.), *Principles and Practice of Emergency Research Response* (pp. 189–211). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-48408-7_11

Hervás-Pérez, J. P., Izcara, S., & Sánchez-Paniagua, M. (2026). Magnetic Beads-Based Electrochemical Label-Free DNA-Bioassay for the Detection of Peanut Allergen Ara h2 in Food Matrices. *Biosensors*, *16*(7), 387. https://doi.org/10.3390/bios16070387

Huang, Z., Lyon, C. J., Wang, J., Lu, S., & Hu, T. Y. (2023a). CRISPR Assays for Disease Diagnosis: Progress to and Barriers Remaining for Clinical Applications. *Advanced Science*, *10*(20), 2301697. https://doi.org/10.1002/advs.202301697

Huang, Z., Lyon, C. J., Wang, J., Lu, S., & Hu, T. Y. (2023b). CRISPR Assays for Disease Diagnosis: Progress to and Barriers Remaining for Clinical Applications. *Advanced Science*, *2301697*, 1–16. https://doi.org/10.1002/advs.202301697

Kemmer, A., Cai, L., Born, S., Cruz Bournazou, M. N., & Neubauer, P. (2024). Enzyme-Mediated Exponential Glucose Release: A Model-Based Strategy for Continuous Defined Fed-Batch in Small-Scale Cultivations. *Bioengineering*, *11*(2), 107. https://doi.org/10.3390/bioengineering11020107

Khoshandam, M., Soltaninejad, H., Hosseinkhani, S., Saltanatpour, Z., Goudarzi, M. T. H., & Hamidieh, A. A. (2024). CRISPR/Cas and artificial intelligence to improve precision medicine: Future perspectives and potential limitations. *Human Gene*, *42*, 201356. https://doi.org/10.1016/j.humgen.2024.201356

Khurshid, A., Akhtar, N., Mir, G., Chopra, C., Singh, R., Chan, J., & Sopanrao, U. (2024). CRISPR/Cas12a-based biosensors for environmental monitoring and diagnostics. *Environmental Technology & Innovation*, *34*(April), 103625. https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103625

Lee, A. T., Ramasamy, R. K., & Subbarao, A. (2025). Understanding Psychosocial Barriers to Healthcare Technology Adoption: A Review of TAM Technology Acceptance Model and Unified Theory of Acceptance and Use of Technology and UTAUT Frameworks. *Healthcare*, *13*(3), 250. https://doi.org/10.3390/healthcare13030250

Lee, M. (2023). Deep learning in CRISPR-Cas systems: A review of recent studies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1226182. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1226182

Lee, S. M., Balakrishnan, H. K., Doeven, E. H., Yuan, D., & Guijt, R. M. (2023). Chemical Trends in Sample Preparation for Nucleic Acid Amplification Testing (NAAT): A Review. *Biosensors*, *13*(11), 980. https://doi.org/10.3390/bios13110980

Li, J., Wu, S., Zhang, K., Sun, X., Lin, W., Wang, C., & Lin, S. (2024). Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-Associated Protein and Its Utility All at Sea: Status, Challenges, and Prospects. *Microorganisms*, *12*(1), 118. https://doi.org/10.3390/microorganisms12010118

Li, Q., & Plebani, M. (2026). Metrological and Algorithmic Traceability of Machine Learning in Laboratory Medicine. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *40*(18), e70321. https://doi.org/10.1002/jcla.70321

Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., He, X., Liu, M., Li, P., & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: Progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 36. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7

Li, Z., Ding, X., Yin, K., Avery, L., Ballesteros, E., & Liu, C. (2020). Instrument-free, CRISPR-based diagnostics of SARS-CoV-2 using self-contained microfluidic system. *Biosensors and Bioelectronics*, (January).

Luo, Y., Pehrsson, M., Langholm, L., Karsdal, M., Bay-Jensen, A.-C., & Sun, S. (2023). Lot-to-Lot Variance in Immunoassays—Causes, Consequences, and Solutions. *Diagnostics*, *13*(11), 1835. https://doi.org/10.3390/diagnostics13111835

Myke-Mbata, B. K., Basil, B., Mba, I. N., & Ugwu, A. O. (2026). Best practices in sample management & pre-analytical quality control: Overcoming challenges in resource-limited laboratory settings. *Tropical Medicine and Health*, *54*(1), 131. https://doi.org/10.1186/s41182-026-01038-x

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., … Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, n71. https://doi.org/10.1136/bmj.n71

Pan, Y., Xu, Q., Rossi, C. S., & Yang, Z. (2026). CRISPR-Enabled Point-of-Care Diagnostics for Early Cancer Detection. *Aggregate*, *7*(7), e70409. https://doi.org/10.1002/agt2.70409

Pan, Z., Xu, L., Fan, Z., Cao, Y., & Ren, F. (2026a). CRISPR-based diagnostics for infectious diseases: Mechanisms , advancements and clinical transformation prospects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, (February). https://doi.org/10.3389/fcimb.2026.1769226

Pan, Z., Xu, L., Fan, Z., Cao, Y., & Ren, F. (2026b). CRISPR-based diagnostics for infectious diseases: Mechanisms, advancements and clinical transformation prospects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *16*, 1769226. https://doi.org/10.3389/fcimb.2026.1769226

Qiu, M., Zhou, X.-M., & Liu, L. (2022). Improved Strategies for CRISPR-Cas12-based Nucleic Acids Detection. *Journal of Analysis and Testing*, *6*(1), 44–52. https://doi.org/10.1007/s41664-022-00212-4

Quintela, I. A., Vasse, T., Lin, C.-S., & Wu, V. C. H. (2022). Advances, applications, and limitations of portable and rapid detection technologies for routinely encountered foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1054782. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1054782

Shao, J., Sun, S., Liu, L., Li, J., Li, R., Dong, H., Wang, Y., Li, G., Dong, C., Yi, M., & Jin, Y. (2026). The impact of multicenter microbiology laboratory workflow optimization on antimicrobial susceptibility testing reporting time and outcomes of patients with bloodstream infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *16*, 1875923. https://doi.org/10.3389/fcimb.2026.1875923

Snyder, H. (2019). Literature review as a research methodology: An overview and guidelines. *Journal of Business Research*, *104*(July), 333–339. https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2019.07.039

Wang, Z., Wang, Q., Zhang, J., Li, B., Li, Y., Chen, Z., Guo, D., & Feng, S. (2025a). CRISPR-driven diagnostics: Molecular mechanisms, clinical efficacy and translational challenges. *Clin. Transl. Med.*, *15:e70482.*(February). https://doi.org/10.1002/ctm2.70482

Wang, Z., Wang, Q., Zhang, J., Li, B., Li, Y., Chen, Z., Guo, D., & Feng, S. (2025b). CRISPR-driven diagnostics: Molecular mechanisms, clinical efficacy and translational challenges. *Clinical and Translational Medicine*, *15*(10), e70482. https://doi.org/10.1002/ctm2.70482

Yuan, Y., He, N., Dong, L., Guo, Q., Zhang, X., Li, B., & Li, L. (2021). Multiscale Shellac-Based Delivery Systems: From Macro- to Nanoscale. *ACS Nano*, *15*(12), 18794–18821. https://doi.org/10.1021/acsnano.1c07121

Zhao, L., Qiu, M., Li, X., Yang, J., Li, J., Mahas, A., Marsic, T., Masson, M. L.-P., Wang, Q., Aman, R., Zheng, C., Ali, Z., Alsanea, M., Al-Qahtani, A., Ghanem, B., Alhamlan, F., & Mahfouz, M. (2022). Characterization of a thermostable Cas13 enzyme for one-pot detection of SARS-CoV-2. *Frontiers in Microbiology*, *Volume 13-2022*(28), e2118260119. https://doi.org/10.1073/pnas.2118260119

Zhou, Z., Cho, I., & Kadam, U. S. (2025a). CRISPR-Cas-Based Diagnostics in Biomedicine: Principles , Applications , and Future Trajectories. *Biosensors*, 1–38.

Zhou, Z., Cho, I.-H., & Kadam, U. S. (2025b). CRISPR-Cas-Based Diagnostics in Biomedicine: Principles, Applications, and Future Trajectories. *Biosensors*, *15*(10), 660. https://doi.org/10.3390/bios15100660