

## Integrasi Multi-Omics, *Liquid Biopsy*, dan Kecerdasan Buatan dalam Biomarker Kanker Kolorektal: Menuju Onkologi Presisi

**Kusmardi**

Departemen Patologi Anatomi  
Fakultas Kedokteran, *Drug Development Research Center, Indonesia Medical Education and Research Institute (IMERI), Human Cancer Research Center*  
IMERI, Kelompok Riset Patobiologi  
Universitas Indonesia

Penulis korespondensi: Prof. Dr. Drs.  
Kusmardi, MS  
Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, *Drug Development Research Center, Indonesia Medical Education and Research Institute (IMERI), Human Cancer Research Center* IMERI, Kelompok Riset Patobiologi  
Universitas Indonesia

### ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) remains one of the leading causes of cancer-related morbidity and mortality worldwide. Advances in molecular biology and high-throughput technologies have significantly expanded the spectrum of biomarkers used in CRC. This review provides an updated and critical synthesis of established and emerging biomarkers in colorectal cancer, focusing on their clinical roles in screening, diagnosis, prognosis, and therapeutic stratification. Established biomarkers such as RAS/BRAF mutations and microsatellite instability (MSI) are integral to clinical practice. Emerging biomarkers including circulating tumor DNA (ctDNA), DNA methylation markers, non-coding RNAs, immune-related biomarkers, and microbiome-based signatures are increasingly relevant. Integration of multi-omics approaches with artificial intelligence (AI) is expected to revolutionize precision oncology. A multi-biomarker panel approach may significantly improve clinical outcomes in CRC.

**Keywords:** colorectal cancer; integrative biomarkers; multi-omics profiling; circulating tumor DNA; liquid biopsy; epigenetic biomarkers; microRNA signatures; artificial intelligence; precision oncology; early detection

### PENDAHULUAN

Kanker kolorektal (*colorectal cancer*/CRC) merupakan salah satu penyebab utama kematian akibat kanker di dunia, dengan lebih dari 1,9 juta kasus baru setiap tahun.<sup>1</sup> Beban penyakit ini tidak hanya tinggi di negara maju, tetapi juga menunjukkan tren peningkatan di negara berkembang seiring perubahan gaya hidup, pola diet, serta peningkatan usia harapan hidup. Selain itu, keterlambatan diagnosis dan keterbatasan akses terhadap skrining berkontribusi terhadap tingginya mortalitas CRC secara global.

Model adenoma–karsinoma yang diperkenalkan oleh Fearon dan Vogelstein menjelaskan bahwa CRC berkembang melalui akumulasi perubahan genetik secara bertahap, yang melibatkan aktivasi onkogen dan inaktivasi gen supresor tumor.<sup>2</sup> Model ini menjadi dasar dalam memahami perjalanan penyakit dari lesi prekursor hingga kanker invasif, serta memberikan kerangka konseptual dalam pengembangan biomarker berbasis molekuler.

Secara molekuler, CRC diklasifikasikan ke dalam tiga jalur utama, yaitu *chromosomal instability* (CIN), *microsatellite instability* (MSI), dan *CpG island methylator phenotype* (CIMP).<sup>3,4</sup> Jalur-jalur ini tidak hanya mencerminkan heterogenitas biologis CRC, tetapi juga memiliki implikasi klinis yang signifikan, khususnya dalam hal prognosis dan respons terhadap terapi. Dengan demikian, pemahaman terhadap karakteristik molekuler ini menjadi landasan dalam pendekatan *precision oncology*.

Dalam praktik klinis modern, biomarker memainkan peran penting dalam seluruh spektrum manajemen CRC, mulai dari skrining populasi risiko, diagnosis dini, stratifikasi prognosis, hingga pemilihan terapi berbasis target.<sup>5</sup> Namun, biomarker konvensional seperti carcinoembryonic antigen (CEA) memiliki keterbatasan, terutama dalam hal sensitivitas pada stadium awal dan spesifisitas terhadap CRC dibandingkan kondisi inflamasi lainnya.<sup>6</sup> Hal ini menunjukkan bahwa kebutuhan akan biomarker yang lebih akurat, sensitif, dan spesifik masih menjadi tantangan utama.

Perkembangan pesat dalam teknologi molekuler, termasuk *next-generation sequencing* (NGS), telah memungkinkan identifikasi biomarker baru yang lebih komprehensif dan berbasis genomik.<sup>7</sup> Selain itu, pendekatan non-invasif seperti *liquid biopsy* yang memanfaatkan *circulating tumor DNA* (ctDNA) membuka peluang baru dalam deteksi dini, monitoring penyakit, serta evaluasi respons terapi secara *real-time*.<sup>8</sup>

Lebih lanjut, integrasi data *multi-omics*—meliputi genomik, epigenomik, transkriptomik, dan proteomik—serta pemanfaatan kecerdasan buatan (*artificial intelligence/AI*) telah mendorong transformasi paradigma dalam identifikasi dan aplikasi biomarker CRC. Pendekatan ini tidak hanya meningkatkan pemahaman terhadap kompleksitas tumor, tetapi juga memungkinkan pengembangan sistem prediksi yang lebih akurat dan personal.

Meskipun berbagai biomarker baru telah dikembangkan, implementasi klinisnya masih menghadapi sejumlah tantangan, termasuk validasi eksternal, standarisasi metode, serta pertimbangan biaya dan aksesibilitas. Oleh karena itu, diperlukan tinjauan komprehensif yang tidak hanya merangkum perkembangan biomarker terkini, tetapi juga mengevaluasi relevansi klinis dan potensi integrasinya dalam praktik kedokteran berbasis bukti.

Berdasarkan latar belakang tersebut, artikel ini bertujuan untuk memberikan pembaruan terkini mengenai biomarker pada kanker kolorektal, dengan penekanan pada integrasi biomarker konvensional dan molekuler, serta arah pengembangan menuju *precision oncology* di masa depan.

## METODE

Pencarian literatur dilakukan secara sistematis menggunakan tiga basis data utama, yaitu PubMed, Scopus, dan Web of Science. Strategi pencarian disusun dengan kombinasi kata kunci dan Boolean operators, meliputi: "*colorectal cancer biomarkers*", "*ctDNA*", "*microsatellite instability*", dan

"*precision oncology*". Selain itu, dilakukan penelusuran tambahan melalui daftar pustaka dari artikel yang relevan (*snowballing*) untuk memastikan cakupan literatur yang komprehensif.

Kriteria inklusi dalam tinjauan ini meliputi: (1) artikel penelitian primer (*original research*) dan review sistematis; (2) publikasi dalam bahasa Inggris; (3) diterbitkan dalam rentang waktu 10–15 tahun terakhir; serta (4) membahas biomarker yang memiliki relevansi klinis dalam aspek skrining, diagnosis, prognosis, atau prediksi respons terapi pada kanker kolorektal. Studi yang tidak memiliki keterkaitan langsung dengan biomarker klinis, laporan kasus, serta artikel dengan kualitas metodologi yang rendah dieksklusi dari analisis.

Proses seleksi artikel dilakukan secara bertahap melalui penyaringan judul dan abstrak, diikuti dengan penilaian teks lengkap (*full-text review*) untuk memastikan kesesuaian dengan kriteria inklusi. Penekanan khusus diberikan pada studi dengan tingkat evidensi tinggi, termasuk uji klinis, meta-analisis, dan penelitian translasi yang relevan dengan praktik klinis.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara naratif dengan pendekatan tematik, yang mengelompokkan biomarker berdasarkan kategori biologisnya, seperti biomarker genetik, epigenetik, transkriptomik, protein, serta biomarker berbasis *liquid biopsy* dan mikrobioma. Selain itu, dilakukan evaluasi kritis terhadap validitas analitik, utilitas klinis, serta potensi implementasi masing-masing biomarker dalam konteks *precision oncology*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Biomarker Konvensional

Carcinoembryonic antigen (CEA) merupakan biomarker yang paling lama dan paling luas digunakan dalam manajemen kanker kolorektal. Secara klinis, CEA memiliki nilai utama dalam pemantauan respons terapi dan deteksi kekambuhan pasca reseksi tumor. Peningkatan kadar CEA setelah terapi kuratif seringkali mendahului temuan radiologis, sehingga memberikan manfaat dalam *surveillance* pasien CRC. Namun demikian, sensitivitas CEA pada stadium awal relatif rendah, sehingga tidak direkomendasikan sebagai alat skrining populasi umum (6,9). Selain itu, kadar CEA juga dapat meningkat pada kondisi non-malignan seperti penyakit inflamasi usus, penyakit hati, dan kebiasaan merokok, yang semakin membatasi spesifisitasnya.

Biomarker lain yang juga digunakan adalah carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9), meskipun penggunaannya dalam CRC lebih

terbatas dibandingkan pada kanker pankreas. CA 19-9 memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih rendah dibandingkan CEA, namun dalam beberapa studi menunjukkan nilai tambahan ketika digunakan secara kombinasi, terutama dalam konteks penyakit lanjut atau metastatik.<sup>10</sup> Kombinasi CEA dan CA 19-9 dilaporkan dapat meningkatkan akurasi prediksi prognosis dibandingkan penggunaan tunggal, meskipun peningkatan tersebut tidak selalu signifikan secara klinis.

Keterbatasan utama biomarker konvensional terletak pada rendahnya sensitivitas pada stadium dini, kurangnya spesifisitas terhadap CRC, serta ketidakmampuan dalam memberikan informasi molekuler yang relevan untuk terapi target. Hal ini menjadi alasan utama mengapa biomarker konvensional saat ini tidak lagi digunakan sebagai alat diagnostik utama, melainkan lebih sebagai parameter tambahan dalam pemantauan penyakit.

Seiring dengan berkembangnya biomarker molekuler dan teknologi diagnostik modern, peran biomarker konvensional telah bergeser menjadi bagian dari pendekatan multimodal. Dalam praktik klinis terkini, CEA dan CA 19-9 lebih sering digunakan dalam kombinasi dengan biomarker genetik, epigenetik, dan *liquid biopsy* untuk meningkatkan akurasi diagnostik dan prognostik. Oleh karena itu, biomarker konvensional tetap memiliki relevansi klinis, namun dalam konteks sebagai komponen dari panel biomarker yang lebih komprehensif (Tabel 1).

## 2. Biomarker Genetik

Biomarker genetik merupakan pilar utama dalam pendekatan *precision oncology* pada kanker kolorektal, karena secara langsung mencerminkan perubahan molekuler yang mendasari karsinogenesis serta menentukan respons terhadap terapi target. Dalam praktik klinis saat ini, analisis mutasi genetik tidak hanya berfungsi sebagai alat prognostik, tetapi juga sebagai dasar pengambilan keputusan terapeutik yang bersifat individual.

Mutasi pada gen RAS, khususnya KRAS dan NRAS, merupakan biomarker prediktif yang paling mapan dalam terapi *anti-epidermal growth factor receptor* (anti-EGFR). Sekitar 40–50% pasien CRC menunjukkan mutasi pada gen KRAS, yang menyebabkan aktivasi konstitutif jalur sinyal downstream EGFR, sehingga mengakibatkan resistensi terhadap terapi seperti cetuximab dan panitumumab.<sup>11,12</sup> Oleh karena itu, pemeriksaan status mutasi RAS telah menjadi standar wajib sebelum pemberian terapi anti-EGFR pada CRC metastatik. Lebih lanjut, bukti klinis menunjukkan bahwa pasien dengan *wild-*

*type RAS* memiliki respons yang lebih baik terhadap terapi tersebut dibandingkan pasien dengan mutasi.

Selain RAS, mutasi BRAF, terutama varian V600E, merupakan biomarker penting yang berhubungan dengan prognosis yang lebih buruk dan karakteristik tumor yang lebih agresif. Mutasi ini ditemukan pada sekitar 8–10% kasus CRC dan sering dikaitkan dengan fenotipe tumor yang lebih invasif, lokasi tumor di kolon kanan, serta kecenderungan metastasis yang lebih tinggi.<sup>13,14</sup> Secara terapeutik, mutasi BRAF juga menjadi target pengembangan terapi kombinasi, seperti inhibitor BRAF yang dikombinasikan dengan anti-EGFR, yang menunjukkan peningkatan outcome pada pasien tertentu.

Selain mutasi onkogen, *microsatellite instability* (MSI) merupakan biomarker genetik yang mencerminkan gangguan pada sistem *DNA mismatch repair* (dMMR). Sekitar 15% CRC menunjukkan status MSI-high, baik yang bersifat sporadik maupun terkait dengan sindrom Lynch (3). Secara biologis, tumor MSI-high memiliki beban mutasi yang tinggi (*high tumor mutational burden*), yang menghasilkan neoantigen dan meningkatkan imunogenisitas tumor. Hal ini menjelaskan mengapa pasien dengan MSI-high menunjukkan respons yang signifikan terhadap imunoterapi berbasis *immune checkpoint inhibitors*, seperti anti-PD-1.<sup>15</sup>

Meskipun biomarker genetik ini telah terbukti memiliki utilitas klinis yang tinggi, terdapat beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Heterogenitas intratumoral dapat menyebabkan variasi hasil pemeriksaan, sementara evolusi klonal selama terapi dapat memunculkan resistensi sekunder. Selain itu, tidak semua pasien dengan profil genetik tertentu menunjukkan respons yang sesuai, yang menunjukkan adanya faktor biologis lain yang belum sepenuhnya dipahami.

Dengan demikian, biomarker genetik tidak hanya berfungsi sebagai alat diagnostik dan prognostik, tetapi juga sebagai fondasi dalam pengembangan terapi presisi berbasis molekuler. Integrasi biomarker genetik dengan pendekatan lain, seperti epigenetik dan *liquid biopsy*, diharapkan dapat meningkatkan akurasi stratifikasi pasien dan efektivitas terapi. Peran sentral biomarker genetik dalam jalur karsinogenesis CRC serta implikasi terapeutiknya dapat dilihat secara skematis pada Gambar 1.

## 3. Biomarker Epigenetik

Perubahan epigenetik, khususnya metilasi DNA, merupakan salah satu peristiwa molekuler paling awal dalam karsinogenesis

kanker kolorektal. Berbeda dengan mutasi genetik yang mengubah urutan DNA, modifikasi epigenetik memengaruhi ekspresi gen tanpa mengubah struktur dasar genom. Hipermetilasi pada wilayah promotor gen—terutama pada *CpG islands*—dapat menyebabkan inaktivasi gen supresor tumor, sehingga berkontribusi terhadap inisiasi dan progresi tumor. Fenomena ini juga berkaitan erat dengan jalur *CpG island methylator phenotype* (CIMP), yang mencerminkan sub tipe molekuler CRC dengan karakteristik biologis dan klinis tertentu.

Dalam konteks klinis, biomarker berbasis metilasi DNA memiliki keunggulan sebagai alat deteksi dini karena perubahan epigenetik terjadi pada tahap awal tumorigenesis. Salah satu biomarker yang paling banyak diteliti adalah methylated SEPT9 (mSEPT9), yang telah dikembangkan menjadi tes berbasis plasma untuk skrining non-invasif kanker kolorektal. Studi menunjukkan bahwa mSEPT9 memiliki sensitivitas sekitar 68–73% dengan spesifisitas yang relatif tinggi dalam mendeteksi CRC, sehingga menjadi alternatif bagi pasien yang tidak menjalani skrining berbasis kolonoskopi.<sup>16,17</sup> Meskipun demikian, sensitivitasnya pada lesi prekanker seperti adenoma lanjut masih terbatas, sehingga penggunaannya lebih tepat sebagai pelengkap daripada pengganti metode skrining konvensional.

Selain mSEPT9, biomarker epigenetik lain seperti SDC2 dan VIM (vimentin) juga menunjukkan potensi signifikan dalam deteksi CRC. Metilasi gen SDC2 telah dilaporkan memiliki performa diagnostik yang baik dalam sampel feses maupun plasma, sementara metilasi VIM sering ditemukan pada jaringan tumor CRC dan dapat digunakan sebagai indikator awal transformasi neoplastik.<sup>18</sup> Namun, sebagaimana biomarker tunggal lainnya, performa diagnostik masing-masing marker ini masih dipengaruhi oleh variasi biologis dan teknis.

Oleh karena itu, pendekatan berbasis panel biomarker epigenetik mulai dikembangkan untuk meningkatkan akurasi diagnostik. Kombinasi beberapa target metilasi DNA dilaporkan mampu meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dibandingkan penggunaan biomarker tunggal, terutama dalam mendeteksi CRC stadium awal. Strategi ini juga memungkinkan penangkapan heterogenitas molekuler tumor yang tidak dapat diwakili oleh satu biomarker saja.

Meskipun menjanjikan, implementasi biomarker epigenetik dalam praktik klinis masih menghadapi beberapa tantangan, termasuk standarisasi metode deteksi, variasi antar platform teknologi, serta kebutuhan validasi

dalam populasi yang lebih luas. Selain itu, faktor pra-analitik seperti kualitas sampel dan stabilitas DNA juga dapat memengaruhi hasil pemeriksaan.

Secara keseluruhan, biomarker epigenetik menawarkan pendekatan yang menjanjikan untuk deteksi dini kanker kolorektal, terutama dalam konteks skrining non-invasif. Integrasi biomarker epigenetik dengan biomarker lain, seperti biomarker genetik dan *liquid biopsy*, diperkirakan akan meningkatkan performa diagnostik secara signifikan. Hal ini menegaskan pentingnya strategi kombinasi biomarker dalam manajemen CRC modern (Tabel 1).

#### 4. Biomarker RNA

Biomarker berbasis RNA, khususnya *non-coding RNA*, telah mendapatkan perhatian yang signifikan dalam beberapa tahun terakhir sebagai kandidat biomarker diagnostik dan prognostik pada kanker kolorektal. Di antara berbagai jenis *non-coding RNA*, microRNA (miRNA) merupakan molekul kecil (~18–25 nukleotida) yang berperan dalam regulasi ekspresi gen melalui mekanisme *post-transcriptional gene silencing*. Perubahan ekspresi miRNA dapat memengaruhi berbagai jalur biologis yang terlibat dalam proliferasi sel, apoptosis, diferensiasi, dan metastasis tumor.

Beberapa miRNA telah diidentifikasi memiliki ekspresi yang konsisten meningkat pada CRC, di antaranya miR-21 dan miR-92a, yang terbukti berperan dalam proses karsinogenesis dan dapat dideteksi baik dalam jaringan tumor maupun sirkulasi perifer. miR-21, misalnya, diketahui berfungsi sebagai *oncomiR* dengan menekan ekspresi gen supresor tumor dan meningkatkan proliferasi serta invasi sel kanker. Sementara itu, miR-92a merupakan bagian dari kluster miR-17-92 yang berperan dalam regulasi siklus sel dan angiogenesis. Kedua miRNA ini menunjukkan potensi sebagai biomarker diagnostik non-invasif, terutama ketika dianalisis dalam plasma atau serum pasien.<sup>19,20</sup>

Keunggulan utama biomarker berbasis miRNA terletak pada stabilitasnya yang relatif tinggi dalam sirkulasi darah, bahkan dalam kondisi ekstrem seperti perubahan suhu atau pH. Hal ini menjadikannya kandidat yang menarik untuk pengembangan tes berbasis *liquid biopsy*. Selain itu, profil ekspresi miRNA dapat mencerminkan status biologis tumor secara dinamis, sehingga berpotensi digunakan dalam monitoring penyakit dan evaluasi respons terapi.

Namun demikian, implementasi klinis biomarker miRNA masih menghadapi berbagai tantangan. Variasi antar studi, baik dalam hal

metode isolasi, platform analisis, maupun populasi penelitian, menyebabkan inkonsistensi hasil yang signifikan.<sup>21</sup> Selain itu, belum adanya standar baku dalam normalisasi data dan *cut-off* nilai diagnostik juga menjadi hambatan utama dalam translasi ke praktik klinis. Faktor pra-analitik seperti hemolisis sampel juga dapat memengaruhi kadar miRNA dalam sirkulasi, sehingga menambah kompleksitas interpretasi hasil.

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, pendekatan berbasis panel miRNA mulai dikembangkan, di mana kombinasi beberapa miRNA digunakan untuk meningkatkan akurasi diagnostik dan prognostik. Integrasi biomarker miRNA dengan biomarker lain, seperti ctDNA dan protein, juga menunjukkan potensi dalam meningkatkan performa deteksi CRC secara keseluruhan.

Secara keseluruhan, biomarker berbasis RNA, khususnya miRNA, menawarkan peluang besar dalam pengembangan diagnostik non-invasif dan personalisasi terapi kanker kolorektal. Namun, diperlukan standardisasi metodologi dan validasi dalam skala besar sebelum biomarker ini dapat diadopsi secara luas dalam praktik klinis.

## 5. *Liquid Biopsy* dan ctDNA

*Liquid biopsy*, khususnya melalui analisis *circulating tumor DNA* (ctDNA), telah merevolusi pendekatan diagnostik dan *monitoring* pada kanker kolorektal dalam era *precision oncology*. ctDNA merupakan fragmen DNA tumor yang dilepaskan ke dalam sirkulasi darah melalui proses apoptosis, nekrosis, maupun sekresi aktif oleh sel tumor. Berbeda dengan biopsi jaringan konvensional yang bersifat invasif dan merepresentasikan kondisi tumor pada satu waktu dan lokasi tertentu, ctDNA memungkinkan pemantauan tumor secara dinamis dan *real-time*.<sup>22</sup>

Keunggulan utama ctDNA terletak pada kemampuannya dalam mencerminkan heterogenitas tumor secara lebih komprehensif, termasuk variasi antar klon tumor dan evolusi molekuler selama perjalanan penyakit. Hal ini menjadikan ctDNA sebagai alat yang sangat potensial tidak hanya untuk deteksi dini, tetapi juga untuk evaluasi respons terapi dan identifikasi mekanisme resistensi.

Dalam praktik klinis, penggunaan ctDNA mencakup beberapa aplikasi utama. Pertama, deteksi *minimal residual disease* (MRD), yaitu keberadaan sel tumor residual setelah terapi kuratif yang tidak dapat dideteksi dengan metode radiologis konvensional. Deteksi MRD berbasis ctDNA memungkinkan identifikasi pasien dengan risiko tinggi kekambuhan, sehingga dapat membantu dalam

pengambilan keputusan terapi adjuvan secara lebih personal. Kedua, monitoring terapi, di mana perubahan kadar ctDNA dapat mencerminkan respons tumor terhadap pengobatan secara lebih cepat dibandingkan evaluasi imaging. Ketiga, deteksi kekambuhan dini, di mana ctDNA mampu mendeteksi relaps beberapa bulan lebih awal dibandingkan biomarker konvensional seperti CEA atau pemeriksaan radiologi.<sup>23,24</sup>

Selain itu, ctDNA juga memiliki potensi dalam mendeteksi mutasi genetik spesifik yang berkaitan dengan resistensi terapi, seperti mutasi sekunder pada jalur EGFR, sehingga memungkinkan penyesuaian terapi secara tepat waktu. Dengan demikian, ctDNA tidak hanya berfungsi sebagai biomarker diagnostik, tetapi juga sebagai alat *real-time molecular monitoring* yang mendukung pengambilan keputusan klinis berbasis data molekuler.

Meskipun menjanjikan, terdapat sejumlah tantangan dalam implementasi ctDNA dalam praktik klinis. Sensitivitas deteksi ctDNA dapat dipengaruhi oleh beban tumor yang rendah, terutama pada stadium awal atau setelah reseksi tumor. Selain itu, variasi dalam metode deteksi, seperti perbedaan platform NGS dan digital PCR, dapat menghasilkan hasil yang tidak konsisten. Standardisasi prosedur laboratorium, penentuan ambang batas (*cut-off*), serta validasi klinis dalam skala besar masih diperlukan untuk memastikan utilitas klinis yang optimal.

Secara keseluruhan, ctDNA merepresentasikan salah satu inovasi paling signifikan dalam bidang biomarker kanker kolorektal. Integrasi ctDNA dengan biomarker lain, termasuk biomarker genetik, epigenetik, dan protein, berpotensi menghasilkan pendekatan diagnostik dan monitoring yang lebih akurat dan komprehensif. Konsep dasar serta aplikasi klinis ctDNA dalam kanker kolorektal divisualisasikan pada Gambar 2, yang menggambarkan alur pelepasan DNA tumor ke sirkulasi dan pemanfaatannya dalam deteksi serta pemantauan penyakit.

## 6. Biomarker Protein dan Stem Cell

Konsep *cancer stem cells* (CSCs) telah menjadi salah satu fokus utama dalam penelitian kanker kolorektal karena perannya dalam inisiasi tumor, progresi penyakit, serta resistensi terhadap terapi. CSCs merupakan subpopulasi sel tumor yang memiliki kemampuan *self-renewal*, diferensiasi, serta kapasitas tinggi untuk membentuk kembali heterogenitas tumor. Dalam konteks ini, identifikasi biomarker protein yang merepresentasikan CSCs menjadi penting untuk memahami dinamika tumor dan

mengembangkan strategi terapi yang lebih efektif.

Beberapa marker permukaan sel telah diidentifikasi sebagai penanda CSC pada kanker kolorektal, di antaranya LGR5 (*leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*), CD44, dan ALDH1. LGR5 merupakan marker yang secara khusus diekspresikan pada sel punca intestinal normal dan sel CSC pada CRC, serta berperan dalam regulasi jalur sinyal Wnt/ $\beta$ -catenin yang krusial dalam karsinogenesis.<sup>25</sup> CD44, sebagai molekul adhesi sel, terlibat dalam interaksi sel dengan mikroenvironment tumor dan berkontribusi terhadap migrasi serta invasi sel kanker.<sup>26</sup> Sementara itu, ALDH1 merupakan enzim yang berperan dalam metabolisme aldehyd dan sering digunakan sebagai indikator aktivitas CSC karena hubungannya dengan kapasitas diferensiasi dan resistensi terhadap stres oksidatif.<sup>27</sup>

Ekspresi marker CSC ini telah terbukti berkorelasi dengan karakteristik tumor yang lebih agresif, termasuk peningkatan kemampuan invasi, metastasis, serta resistensi terhadap kemoterapi dan radioterapi. Secara khusus, keberadaan CSCs diyakini berkontribusi terhadap kegagalan terapi konvensional dan kekambuhan penyakit, karena sel-sel ini mampu bertahan setelah paparan terapi dan kemudian meregenerasi populasi tumor.<sup>28</sup> Oleh karena itu, CSCs tidak hanya berperan sebagai biomarker prognostik, tetapi juga sebagai target potensial dalam pengembangan terapi baru.

Namun demikian, penggunaan biomarker CSC dalam praktik klinis masih menghadapi beberapa tantangan. Ekspresi marker seperti LGR5, CD44, dan ALDH1 tidak selalu spesifik untuk CSC, karena juga dapat ditemukan pada sel normal atau subpopulasi sel tumor lainnya. Selain itu, heterogenitas ekspresi antar pasien dan bahkan dalam satu tumor yang sama (*intra-tumoral heterogeneity*) dapat membatasi akurasi interpretasi. Metode deteksi yang berbeda, seperti imunohistokimia versus analisis molekuler, juga dapat menghasilkan variasi hasil yang signifikan.

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, pendekatan berbasis kombinasi marker CSC mulai dikembangkan guna meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas deteksi. Integrasi biomarker CSC dengan biomarker lain, seperti biomarker genetik dan epigenetik, juga berpotensi memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai biologi tumor.

Secara keseluruhan, biomarker protein yang merepresentasikan CSC menawarkan wawasan penting mengenai mekanisme resistensi terapi dan progresi kanker kolorektal.

Meskipun masih dalam tahap pengembangan translasi, pendekatan ini memiliki potensi besar dalam mendukung strategi terapi yang lebih terarah dan efektif di masa depan.

## 7. Biomarker Immunologi

Peran sistem imun dalam karsinogenesis kanker kolorektal semakin mendapat perhatian, terutama dengan berkembangnya terapi imun berbasis *immune checkpoint inhibitors*. Interaksi antara sel tumor dan mikroenvironment imun tidak hanya memengaruhi progresi penyakit, tetapi juga menentukan respons terhadap terapi. Oleh karena itu, biomarker imunologi menjadi komponen penting dalam stratifikasi pasien dan pemilihan terapi yang tepat.

Salah satu biomarker imunologi yang paling banyak diteliti adalah *tumor-infiltrating lymphocytes* (TILs), yang mencerminkan tingkat respons imun terhadap tumor. Kepadatan dan distribusi TILs, khususnya sel T CD8+ sitotoksik, telah terbukti berkorelasi dengan prognosis yang lebih baik pada pasien CRC. Pendekatan kuantitatif terhadap infiltrasi sel imun ini bahkan telah dikembangkan menjadi *Immunoscore*, yang menunjukkan nilai prognostik yang kuat dan dalam beberapa studi melampaui sistem staging konvensional berbasis TNM.<sup>29,30</sup> Hal ini menegaskan bahwa komponen imun mikroenvironment tumor merupakan determinan penting dalam perjalanan penyakit.

Selain TILs, ekspresi *programmed death-ligand 1* (PD-L1) pada sel tumor dan sel imun juga merupakan biomarker penting dalam konteks imunoterapi. Interaksi antara PD-L1 dan reseptornya, PD-1, berperan dalam menghambat aktivasi sel T, sehingga memungkinkan sel tumor menghindari respons imun. Oleh karena itu, ekspresi PD-L1 sering digunakan sebagai indikator potensial respons terhadap terapi *checkpoint inhibitors*. Namun, pada CRC, khususnya pada subtype *microsatellite stable* (MSS), ekspresi PD-L1 tidak selalu berkorelasi kuat dengan respons terapi, sehingga penggunaannya sebagai biomarker tunggal masih terbatas dan perlu dikombinasikan dengan parameter lain.

Selain biomarker berbasis jaringan tumor, marker inflamasi sistemik seperti *neutrophil-to-lymphocyte ratio* (NLR) juga telah diidentifikasi sebagai indikator prognostik pada CRC. Nilai NLR yang tinggi mencerminkan kondisi inflamasi sistemik dan imunosupresi relatif, yang berkaitan dengan prognosis yang lebih buruk serta respons terapi yang kurang optimal.<sup>31</sup> Keunggulannya terletak pada kemudahannya untuk diukur secara rutin melalui pemeriksaan darah perifer, sehingga

berpotensi digunakan sebagai biomarker yang praktis dan cost-effective.

Meskipun biomarker imunologi menunjukkan potensi yang besar, terdapat beberapa keterbatasan dalam implementasinya. Variabilitas dalam metode pengukuran, perbedaan *cut-off* nilai, serta heterogenitas *microenvironment tumor* dapat memengaruhi interpretasi hasil. Selain itu, dinamika interaksi imun-tumor yang kompleks menunjukkan bahwa satu biomarker tunggal mungkin tidak cukup untuk memprediksi respons terapi secara akurat.

Oleh karena itu, pendekatan integratif yang menggabungkan berbagai biomarker imunologi, termasuk TILs, PD-L1, dan marker inflamasi sistemik, semakin dikembangkan untuk meningkatkan akurasi stratifikasi pasien. Integrasi ini juga dapat dikombinasikan dengan biomarker molekuler lainnya, seperti MSI dan tumor mutational burden, guna memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai status imunologis tumor.

Secara keseluruhan, biomarker imunologi memainkan peran penting dalam pengembangan terapi berbasis imun dan precision oncology pada kanker kolorektal. Pendekatan yang lebih holistik dan integratif diharapkan dapat meningkatkan efektivitas terapi serta outcome klinis pasien di masa depan.

## 8. Biomarker Mikrobioma

Peran mikrobiota usus dalam karsinogenesis kanker kolorektal telah menjadi fokus penelitian yang semakin berkembang dalam dekade terakhir. Usus manusia merupakan ekosistem kompleks yang dihuni oleh triliunan mikroorganisme, yang secara fisiologis berperan dalam menjaga homeostasis, metabolisme, dan fungsi imun. Ketidakseimbangan komposisi mikrobiota (*dysbiosis*) telah dikaitkan dengan berbagai penyakit, termasuk kanker kolorektal, melalui mekanisme yang melibatkan inflamasi kronis, produksi metabolit karsinogenik, serta modulasi respons imun.

Salah satu mikroorganisme yang paling konsisten dikaitkan dengan CRC adalah *Fusobacterium nucleatum*, yang ditemukan dalam jumlah tinggi pada jaringan tumor dibandingkan jaringan normal. Bakteri ini diketahui berperan dalam mempromosikan karsinogenesis melalui berbagai mekanisme, termasuk aktivasi jalur sinyal inflamasi, modulasi *microenvironment tumor*, serta peningkatan proliferasi dan invasi sel kanker.<sup>32</sup> Selain itu, *Fusobacterium nucleatum* juga berhubungan dengan resistensi terhadap kemoterapi, yang menunjukkan bahwa mikrobioma tidak hanya berperan dalam inisiasi tumor tetapi juga dalam respons terhadap terapi.

Selain *Fusobacterium nucleatum*, berbagai perubahan komposisi mikrobiota usus lainnya juga telah diidentifikasi pada pasien CRC, seperti peningkatan bakteri pro-inflamasi dan penurunan bakteri komensal yang bersifat protektif. Perubahan ini dapat menghasilkan metabolit seperti asam empedu sekunder dan senyawa pro-karsinogenik lainnya yang berkontribusi terhadap kerusakan DNA dan progresi tumor. Dengan demikian, profil mikrobiota usus mencerminkan interaksi kompleks antara faktor lingkungan, diet, dan predisposisi genetik dalam perkembangan CRC.

Dalam konteks klinis, biomarker berbasis mikrobioma menawarkan potensi sebagai alat diagnostik non-invasif, misalnya melalui analisis sampel feses. Profil mikrobiota tertentu dapat digunakan untuk membedakan individu dengan CRC dari individu sehat, bahkan pada stadium awal penyakit. Selain itu, biomarker mikrobioma juga berpotensi digunakan untuk memprediksi respons terhadap terapi, termasuk kemoterapi dan imunoterapi, sehingga mendukung pendekatan terapi yang lebih personal.

Namun, implementasi biomarker mikrobioma dalam praktik klinis masih menghadapi berbagai tantangan. Variabilitas komposisi mikrobiota antar individu, yang dipengaruhi oleh faktor diet, lingkungan, penggunaan antibiotik, dan faktor geografis, dapat memengaruhi konsistensi hasil. Selain itu, belum adanya standar baku dalam metode analisis, seperti teknik sekuensing dan interpretasi data bioinformatika, menjadi hambatan dalam translasi ke penggunaan klinis yang luas.

Oleh karena itu, pendekatan berbasis integrasi mikrobioma dengan biomarker lain, seperti biomarker genetik, epigenetik, dan imunologi, mulai dikembangkan untuk meningkatkan akurasi diagnostik dan prognostik. Pendekatan ini juga membuka peluang pengembangan strategi terapi baru, seperti modulasi mikrobiota melalui probiotik, prebiotik, atau transplantasi mikrobiota feses.

Secara keseluruhan, biomarker mikrobioma merepresentasikan frontier baru dalam penelitian kanker kolorektal, dengan potensi besar dalam mendukung deteksi dini, stratifikasi risiko, dan personalisasi terapi. Perubahan mikrobiota usus tidak hanya berfungsi sebagai indikator penyakit, tetapi juga sebagai target intervensi terapeutik yang menjanjikan.<sup>33</sup>

## 9. Multi-Omics dan Artificial Intelligence

Pendekatan *multi-omics* merepresentasikan evolusi penting dalam penelitian biomarker kanker kolorektal, dengan mengintegrasikan berbagai lapisan data biologis, termasuk

genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik, dan metabolomik. Pendekatan ini memungkinkan pemahaman yang lebih komprehensif terhadap kompleksitas biologis tumor, termasuk heterogenitas intra- dan inter-tumoral, serta dinamika evolusi kanker sepanjang perjalanan penyakit.<sup>34</sup> Dengan demikian, multi-omics tidak hanya berkontribusi pada identifikasi biomarker baru, tetapi juga pada pengembangan model klasifikasi molekuler yang lebih presisi.

Namun, kompleksitas dan volume data yang dihasilkan dari pendekatan multi-omics memerlukan metode analitik yang canggih. Dalam konteks ini, *artificial intelligence* (AI), khususnya *machine learning* dan *deep learning*, memainkan peran krusial dalam ekstraksi pola, integrasi data, serta prediksi outcome klinis. Salah satu aplikasi AI yang paling berkembang adalah kemampuan untuk memprediksi status *microsatellite instability* (MSI) secara langsung dari citra histopatologi digital, tanpa memerlukan pengujian molekuler tambahan.<sup>35</sup> Pendekatan ini menunjukkan potensi besar dalam meningkatkan efisiensi diagnostik, terutama di pusat layanan dengan keterbatasan fasilitas molekuler.

Selain itu, AI juga digunakan dalam analisis data biomarker kompleks, termasuk integrasi berbagai parameter molekuler untuk memprediksi prognosis, respons terapi, serta risiko kekambuhan.<sup>36</sup> Model prediktif berbasis AI mampu menggabungkan data klinis, molekuler, dan radiologis untuk menghasilkan keputusan yang lebih akurat dan personal dibandingkan pendekatan konvensional.

Integrasi multi-omics dengan biomarker berbasis *liquid biopsy* semakin memperkuat pendekatan ini. Studi terbaru menunjukkan bahwa kombinasi antara ctDNA dan biomarker protein dapat meningkatkan akurasi diagnosis kanker secara signifikan dibandingkan penggunaan biomarker tunggal.<sup>47</sup> Selain itu, tes berbasis DNA feses multi-target, yang menggabungkan analisis mutasi genetik dan metilasi DNA, telah terbukti efektif

dalam skrining CRC dan telah mulai diimplementasikan dalam praktik klinis.<sup>48</sup>

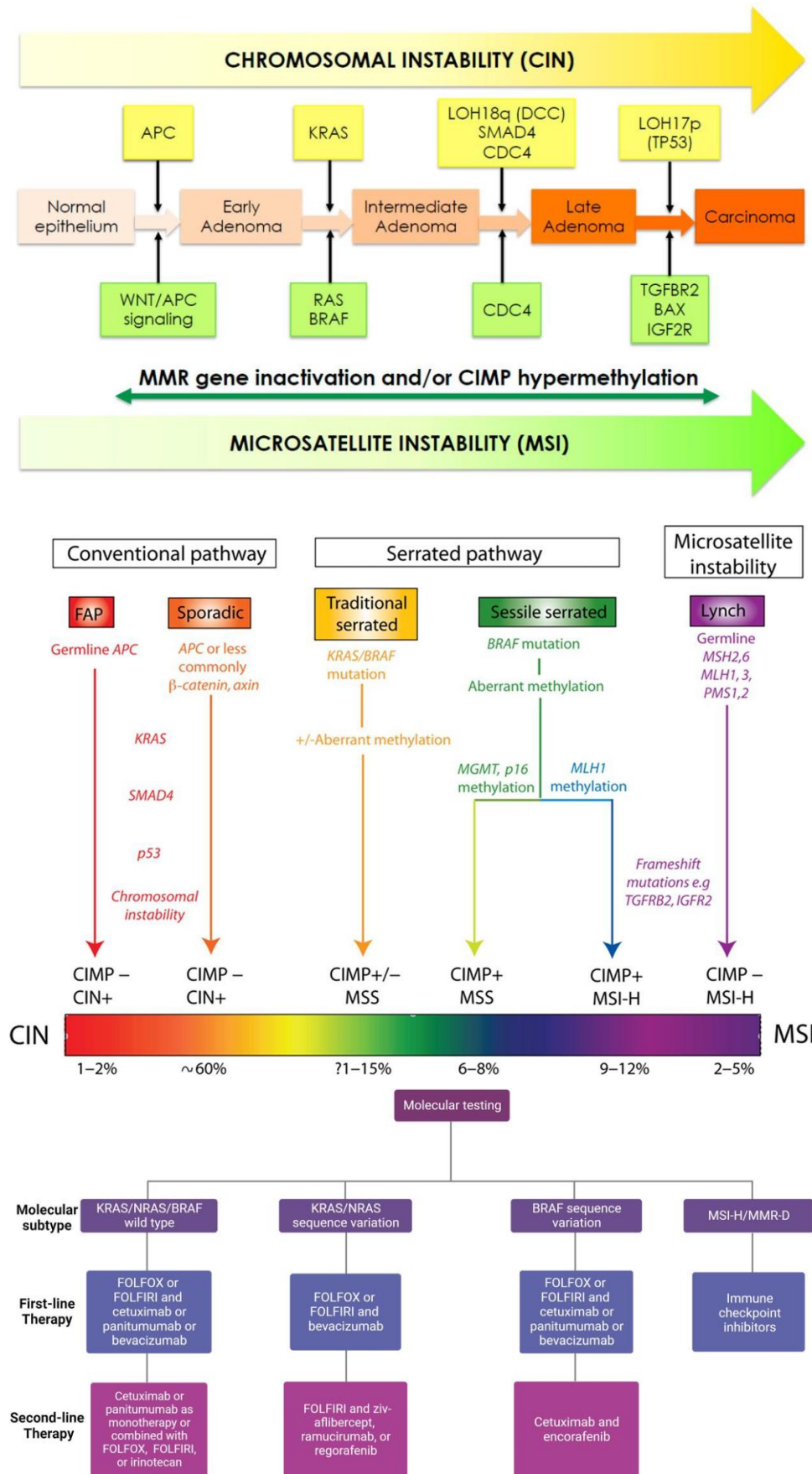
Lebih lanjut, profil metilasi ctDNA memberikan potensi besar dalam deteksi dini kanker kolorektal, bahkan sebelum munculnya manifestasi klinis yang jelas.<sup>49</sup> Pendekatan ini memungkinkan identifikasi perubahan epigenetik spesifik yang terkait dengan tumor secara sensitif dan spesifik. Selain itu, analisis longitudinal ctDNA memungkinkan pemantauan dinamika penyakit secara *real-time* dan telah terbukti memiliki nilai prognostik dalam memprediksi *outcome* pasien, termasuk risiko kekambuhan dan respons terhadap terapi.<sup>50</sup>

Meskipun menjanjikan, penerapan *multi-omics* dan AI dalam praktik klinis masih menghadapi sejumlah tantangan. Standardisasi data, interoperabilitas antar platform, serta kebutuhan validasi eksternal dalam populasi yang luas menjadi hambatan utama. Selain itu, aspek etika dan regulasi terkait penggunaan AI dalam pengambilan keputusan klinis juga perlu diperhatikan, termasuk transparansi algoritma dan interpretabilitas hasil.

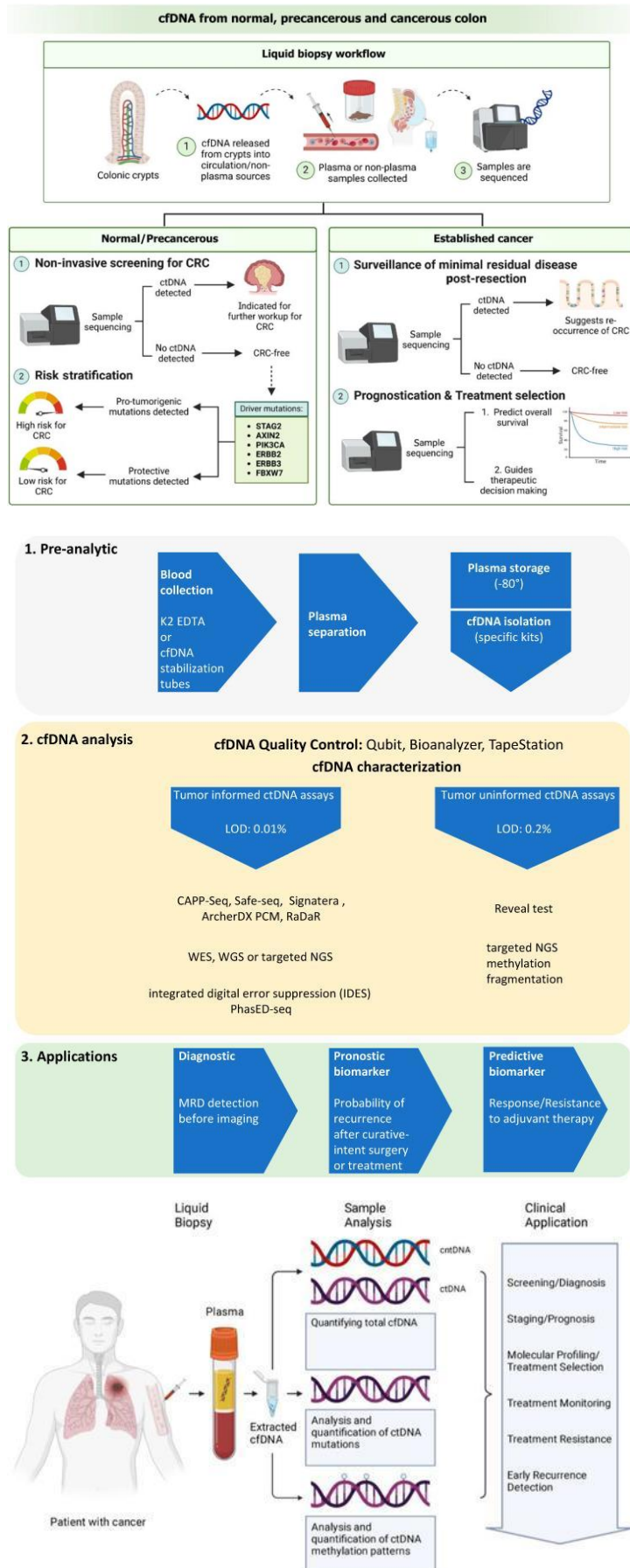
Secara keseluruhan, integrasi multi-omics dan artificial intelligence menandai era baru dalam precision oncology pada kanker kolorektal. Pendekatan ini tidak hanya meningkatkan akurasi diagnostik dan prognostik, tetapi juga membuka peluang untuk pengembangan strategi terapi yang lebih personal dan adaptif. Ke depan, sinergi antara teknologi molekuler dan komputasi cerdas diharapkan dapat mengubah paradigma manajemen CRC dari pendekatan reaktif menjadi prediktif dan preventif.

Tabel 1. Biomarker CRC Berbasis Bukti Klinis

Biomarker	Kategori	Metode	Peran Klinis	Level Evidence
KRAS	Genetik	PCR/NGS	Prediktif terapi	Tinggi
BRAF	Genetik	PCR/NGS	Prognostik	Tinggi
MSI	Genetik	PCR/IHC	Imunoterapi	Tinggi
CEA	Protein	Serum	Monitoring	Sedang
mSEPT9	Epigenetik	PCR	Skrining	Sedang
ctDNA	Liquid biopsy	NGS	MRD	Tinggi
miRNA	RNA	qPCR	Diagnostik	Rendah
LGR5	Protein	IHC	Prognostik	Rendah
PD-L1	Imunologi	IHC	Prediktif	Sedang
Mikrobioma	Omics	Sequencing	Diagnostik	Emerging



Gambar 1. Jalur Molekuler CRC dan Biomarker.



Gambar 2. Konsep *Liquid Biopsy* dan ctDNA.

## DISKUSI

Perkembangan biomarker pada kanker kolorektal menunjukkan adanya pergeseran paradigma yang signifikan, dari pendekatan berbasis biomarker tunggal menuju strategi integratif berbasis *multi-omics*. Pendekatan ini memungkinkan pemahaman yang lebih komprehensif terhadap kompleksitas biologis tumor, termasuk heterogenitas molekuler dan dinamika evolusi penyakit. Integrasi berbagai lapisan data—genetik, epigenetik, transkriptomik, proteomik, serta data berbasis mikrobioma dan imunologi—memberikan peluang untuk mengidentifikasi profil biomarker yang lebih akurat dan relevan secara klinis.<sup>34</sup>

Dalam konteks praktik klinis saat ini, biomarker klasik seperti mutasi KRAS dan status *microsatellite instability* (MSI) tetap menjadi fondasi utama dalam stratifikasi terapi, khususnya dalam menentukan kandidat terapi target dan imunoterapi. Namun, biomarker tersebut memiliki keterbatasan dalam menangkap dinamika penyakit secara *real-time*. Dalam hal ini, *circulating tumor DNA* (ctDNA) dan biomarker epigenetik muncul sebagai pelengkap yang menjanjikan, terutama dalam deteksi dini, identifikasi *minimal residual disease*, serta monitoring respons terapi secara longitudinal.<sup>24</sup> Kombinasi antara biomarker statis (berbasis jaringan) dan biomarker dinamis (berbasis sirkulasi) menjadi pendekatan yang semakin relevan dalam manajemen CRC modern.

Meskipun kemajuan ini sangat menjanjikan, implementasi klinis biomarker baru masih menghadapi berbagai tantangan. Salah satu isu utama adalah kurangnya standarisasi dalam metode deteksi, baik pada tingkat pra-analitik (pengambilan dan penyimpanan sampel) maupun analitik (platform teknologi dan interpretasi hasil). Variasi antar laboratorium dan platform dapat menghasilkan perbedaan hasil yang signifikan, sehingga membatasi reproduibilitas dan generalisasi temuan. Selain itu, biaya yang relatif tinggi untuk teknologi seperti *next-generation sequencing* dan analisis *multi-omics* juga menjadi hambatan dalam penerapan luas, terutama di negara dengan sumber daya terbatas.<sup>25</sup>

Selain aspek teknis dan ekonomi, tantangan lain yang tidak kalah penting adalah kebutuhan akan validasi klinis dalam skala besar dan populasi yang beragam. Banyak biomarker yang menunjukkan hasil menjanjikan dalam studi awal, namun belum memiliki bukti kuat dari uji klinis prospektif yang mendukung penggunaannya secara rutin. Hal ini menekankan pentingnya pendekatan berbasis bukti (*evidence-based implementation*) dalam translasi biomarker ke praktik klinis.

Dalam menghadapi kompleksitas data biomarker yang semakin meningkat, integrasi *artificial intelligence* (AI) menawarkan solusi yang potensial. AI mampu mengolah dan menganalisis data dalam jumlah besar secara efisien, serta mengidentifikasi pola yang tidak dapat dikenali melalui analisis konvensional. Aplikasi AI dalam prediksi MSI dari citra histopatologi serta dalam integrasi data *multi-omics* telah menunjukkan peningkatan akurasi diagnostik dan prognostik yang signifikan (35,36). Selain itu, AI juga berpotensi dalam mendukung pengambilan keputusan klinis melalui sistem *decision support* yang berbasis data.

Namun demikian, penggunaan AI dalam bidang kesehatan juga menimbulkan tantangan tersendiri, termasuk isu transparansi algoritma (*black box problem*), kebutuhan akan dataset yang representatif, serta aspek etika dan regulasi. Oleh karena itu, implementasi AI harus dilakukan secara hati-hati dengan mempertimbangkan validitas, reliabilitas, dan akuntabilitas sistem yang digunakan.

Secara keseluruhan, integrasi biomarker berbasis *multi-omics* dengan dukungan AI menandai transformasi menuju *precision oncology* yang lebih adaptif dan personal. Pendekatan ini tidak hanya berpotensi meningkatkan akurasi diagnosis dan efektivitas terapi, tetapi juga memungkinkan pergeseran paradigma dari pengobatan reaktif menjadi strategi prediktif dan preventif. Ke depan, keberhasilan implementasi pendekatan ini akan sangat bergantung pada kolaborasi multidisiplin, standarisasi global, serta penguatan bukti klinis melalui studi prospektif berskala besar.

## KESIMPULAN

Perkembangan biomarker pada kanker kolorektal menunjukkan transformasi yang signifikan menuju pendekatan *multi-biomarker* yang terintegrasi dan berbasis *precision oncology*. Jika sebelumnya biomarker digunakan secara terpisah dan terbatas pada fungsi diagnostik atau prognostik, kini terjadi pergeseran menuju integrasi berbagai domain biomarker yang mencerminkan kompleksitas biologis tumor secara lebih komprehensif.

Pendekatan ini menggabungkan biomarker genetik, epigenetik, *liquid biopsy* (terutama *circulating tumor DNA*), serta teknologi *artificial intelligence* (AI), yang secara kolektif memungkinkan peningkatan akurasi dalam deteksi dini, stratifikasi risiko, pemilihan terapi, serta monitoring penyakit secara *real-time*. Integrasi ini tidak hanya meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik, tetapi juga membuka peluang untuk pengembangan

strategi terapi yang lebih personal, adaptif, dan berbasis dinamika molekuler tumor.

Meskipun demikian, implementasi klinis dari pendekatan multi-biomarker ini masih menghadapi berbagai tantangan, termasuk kebutuhan standarisasi metode, validasi dalam populasi besar, serta pertimbangan biaya dan aksesibilitas. Selain itu, integrasi data kompleks yang dihasilkan dari berbagai platform memerlukan dukungan sistem analitik yang canggih, di mana AI diharapkan memainkan peran sentral.

Ke depan, pengembangan biomarker CRC diharapkan tidak hanya berfokus pada identifikasi marker baru, tetapi juga pada integrasi lintas disiplin yang menggabungkan data molekuler, klinis, dan komputasional. Pendekatan ini berpotensi mengubah paradigma manajemen kanker kolorektal dari model yang bersifat reaktif menjadi prediktif dan preventif.

Dengan demikian, penerapan strategi multi-biomarker yang terintegrasi merupakan langkah kunci dalam mewujudkan precision oncology yang lebih efektif dan berkelanjutan pada kanker kolorektal.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7–30.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759–67.
3. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073–87.
4. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350–6.
5. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(2):79–92.
6. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem*. 2001;47(4):624–30.
7. Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017;18(1):83.
8. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019;394(10207):1467–80.
9. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for tumor markers in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(33):5313–27.
10. Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Järvinen HJ, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Clin Chem*. 2002;48(10):1600–6.
11. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757–65.
12. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for metastatic colorectal cancer. *Lancet*. 2016;388(10042):113–24.
13. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–54.
14. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, et al. Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(1):77–87.
15. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
16. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*. 2008;54(2):414–23.
17. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of colorectal cancer. *Lancet*. 2014;384(9937):184–90.
18. Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, et al. Genome-wide identification of DNA methylation markers for colorectal cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2013;19(17):4745–55.
19. Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, et al. Serum miR-21 as a diagnostic biomarker in colorectal cancer. *Ann Surg*. 2013;258(2):356–62.
20. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of colorectal cancer patients. *Gut*. 2009;58(10):1375–81.
21. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers. *Clin Chem*. 2008;54(10):1624–33.

22. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223–38.
23. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of plasma ctDNA to detect minimal residual disease in colorectal cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(8):1124–31.
24. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease. *Sci Transl Med*. 2016;8(346):346ra92.
25. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of ctDNA detection. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(7):419–34.
26. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon. *Nature*. 2007;449(7165):1003–7.
27. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification of human colon cancer stem cells. *Nature*. 2007;445(7123):111–5.
28. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth. *Nature*. 2007;445(7123):106–10.
29. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4.
30. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the Immunoscore. *Lancet*. 2018;391(10135):2128–39.
31. Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based NLR. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(5):534–40.
32. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):207–15.
33. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348(6230):80–6.
34. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches. *Genome Biol*. 2017;18:83.
35. Echle A, Grabsch HI, Quirke P, van den Brandt PA, West NP, Hutchins GGA, et al. Deep learning for MSI prediction. *Nat Med*. 2020;26(5):742–8.
36. Kather JN, Pearson AT, Halama N, Jäger D, Krause J, Loosen SH, et al. Deep learning can predict MSI from histology. *Nat Med*. 2019;25(7):1054–6.
37. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN guidelines insights: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(4):359–69.
38. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG, Parikh AR, Niedzwiecki D, Pereira AAL, et al. Genomic landscape of cell-free DNA in CRC. *J Clin Oncol*. 2018;36(15):1574–81.
39. Kasi PM, Kotani D, Cecchini M, Shitara K, Fakhri M. ctDNA applications in CRC. *JCO Precis Oncol*. 2020;4:PO.19.00277.
40. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Nivolumab in MSI-high CRC. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773–9.
41. Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, El-Deiry WS, Hwang JJ, Gatalica Z, et al. Comparative molecular analyses of left-sided vs right-sided CRC. *Clin Cancer Res*. 2017;23(15):4220–30.
42. Lenz HJ, Ou FS, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, et al. Impact of tumor sidedness. *J Clin Oncol*. 2017;35(6):652–8.
43. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, et al. Molecular diagnostics in CRC. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi64–9.
44. Sveen A, Kopetz S, Lothe RA. Biomarker-guided therapy for CRC. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(5):266–80.
45. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):303–12.
46. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB, Boland P, et al. CRC: current and emerging strategies. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):26.
47. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Combined ctDNA and protein biomarkers. *Science*. 2018;359(6378):926–30.
48. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing. *N Engl J Med*. 2014;370(14):1287–97.
49. Luo H, Zhao Q, Wei W, Zheng L, Yi S, Li G, et al. Circulating tumor DNA methylation profiles. *Gut*. 2020;69(5):879–89.
50. Wang Y, Li L, Cohen JD, Kinde I, Ptak J, Popoli M, et al. Prognostic potential of ctDNA. *Cancer Lett*. 2019;457:108–17.