

# Optimasi dan Evaluasi Whole Genome Sequencing SARS CoV-2 Di Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah

## Optimization and Evaluation of Whole genome sequencing of SARS CoV-2 at the Center for Health Laboratory and Testing of Medical Devices in Central Java Province

Hediningsih, Yekti; Nurhafid, Mohammad; Wahyuni, Endah; Hapsari, Dyah Ayu Kunti; Purnomo, Purnomo; Marwiyah, Marwiyah; Sulistiyanto, Hendrik; Farhati, Ismi; Handayani, Sekti; Peni, Wiwik

### Yekti Hediningsih

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

 **Mohammad Nurhafid** m.nurhafid15@gmail.com  
PT. Artha Genetikalab Indonesia, Indonesia

### Endah Wahyuni

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Dyah Ayu Kunti Hapsari

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Purnomo Purnomo

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Marwiyah Marwiyah

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Hendrik Sulistiyanto

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Ismi Farhati

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Sekti Handayani

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

### Wiwik Peni

Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

**Ringkasan:** SARS CoV-2 merupakan virus yang menyebar hampir seluruh Negara di dunia termasuk Indonesia. Whole genome sequencing merupakan metode yang paling tepat digunakan untuk mendeteksi beberapa varian dan mutasi gen dari SARS CoV-2. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui dan evaluasi pengerjaan whole genome SARS CoV-2 berdasarkan nilai keberhasilan dan indikator sekuensing di Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. Metode survei digunakan dalam penelitian ini di mana sampel diambil dari beberapa daerah yaitu Jawa tengah, Jawa Barat, Banten dan Jakarta. Analisis keberhasilan didasarkan pada hasil fasta dari analisis Dragen COVID Lineage. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase keberhasilan dari empat batch pengerjaan menunjukkan bahwa dua batch terakhir mendapatkan persentase lebih tinggi dibandingkan dengan dua batch pertama. Primer pool artic yang digunakan yaitu versi V3 dan V4 diduga kuat sebagai faktor yang mempengaruhi keberhasilan tersebut di mana versi V4 menunjukkan performa yang lebih baik dan cocok digunakan dalam pengerjaan whole genome sequencing SARS CoV-2 di Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. Beberapa indikator digunakan sebagai penilaian standar evaluasi yaitu cluster density, passing filter dan Q30 yang disesuaikan dengan instrument yang digunakan.

**Kata kunci:** Whole genome sequencing, Primer pool artic, Indikator sekuensing, SARS CoV-2.

**Abstract:** SARS CoV-2 is a virus that has spread to almost all countries in the world, including Indonesia. *Whole genome sequencing* is most appropriate for detecting several variants and gene mutations of SARS CoV-2. The purpose of this study

## Health Information: Jurnal Penelitian

Poltekkes Kemenkes Kendari, Indonesia  
ISSN: 2085-0840  
ISSN-e: 2622-5905  
Periodicity: Bianual  
vol. 15, no. 1, 2023  
jurnaldanhakcipta@poltekkes-kdi.ac.id

Received: 19 October 2022

Accepted: 25 January 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/504/5043980001/>

DOI: <https://doi.org/10.36990/hijp.v15i1.706>

### Funding

Funding source: Nihil.

Corresponding author: m.nurhafid15@gmail.com

Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License that allows others to share the work with an acknowledgment of the work's authorship and initial publication in this journal and able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book).



This work is licensed under Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International.

was to identify and evaluate the entire SARS CoV-2 genome based on success and sequencing indicators at the Central Java Province Health Laboratory and Medical Device Testing Center. The survey method used in this study where samples were taken from several regions, namely Central Java, West Java, Banten and Jakarta. The analysis is based on fasta results from the Dragen COVID lineage analysis. The results showed that the proportion of success of the four working *batches* showed that the last two *batches* got a higher percentage than the first two *batches*. Pool artic primers used, namely versions V3 and V4 are strongly suspected as factors that influence the success where the V4 version shows better performance and is suitable for use in the *whole genome sequencing* of SARS CoV-2 at the Central Java Provincial Health Laboratory and Medical Device Testing Center. Several indicators are used as evaluation standards, namely *cluster density*, passing filter and Q30 which are adjusted to the instrument used.

**Keywords:** *Whole genome sequencing*, Pool artic primer, Sequencing indicator, SARS CoV-2.

## PENDAHULUAN

SARS CoV-2 merupakan virus baru yang pertama kali ditemukan di Wuhan, China pada akhir tahun 2019 dan menyebar hampir ke seluruh Negara di dunia (Phelan et al., 2020). Organisasi kesehatan dunia (WHO) mengumumkan pada awal tahun 2020 bahwa penyakit COVID-19 sebagai keadaan darurat kesehatan masyarakat. Di Indonesia, kasus COVID-19 pertama dan kedua diumumkan pada tanggal 12 Maret 2020. Berdasarkan kasus yang ditemukan, mulai teridentifikasi kluster-kluster dari SARS CoV-2 yang tersebar di beberapa wilayah di Indonesia. Hingga awal tahun 2022, persebaran semakin meningkat hingga tercatat beberapa varian baru terutama varian Delta dan Omicron (Turista et al., 2020). Salah satu daerah di Indonesia tercatat sebagai daerah dengan tingkat kasus tergolong tinggi adalah Provinsi Jawa Tengah (Philips & Wicaksono, 2020)

Berbagai teknik molekuler banyak digunakan untuk mendeteksi keberadaan dari SARS CoV-2 seperti deteksi gen spesifik, *genotyping* hingga pengurutan asam nukleat. *Whole genome sequencing* (WGS) merupakan salah satu metode pengurutan asam nukleat secara utuh. Metode tersebut diketahui memiliki keunggulan lebih dibandingkan dengan metode lain, misalnya *targeted sequencing*. *Whole genome sequencing* mampu mendeteksi perubahan asam nukleat yang terjadi pada semua gen sehingga metode tersebut dijadikan sebagai metode monitoring perkembangan dan persebaran SARS CoV-2 di suatu wilayah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metode WGS berhasil digunakan pada genome virus SARS CoV-2 untuk mengetahui mutasi, pemetaan

persebaran hingga deteksi beberapa varian baru (Gunadi et al., 2020; Massi et al., 2022). Di Indonesia, metode WGS masih sangat jarang sekali dilakukan. Hal tersebut karena metode WGS merupakan cara baru dan proses pengerjaannya yang memerlukan pelatihan keterampilan lanjutan.

Pengembangan dan perbaikan metode WGS perlu dilakukan guna mendapatkan hasil secara maksimal. Optimasi dapat dilakukan sebagai langkah untuk mengetahui komponen-komponen yang digunakan serta proses dalam pengerjaan. Primer merupakan komponen yang sangat penting dalam persiapan sampel ampikon. Laju mutasi yang sangat cepat dari SARS CoV-2 diduga menjadi faktor yang mempengaruhi dalam keberhasilan amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* dan sekuensing. Selain itu, untuk mengevaluasi hasil sekuensing ada beberapa indikator penting yang dapat terapkan sebagai luaran kualitas dari hasil pengerjaan WGS yaitu nilai *cluster density*, *passing filter* dan Q30. Nilai indikator tersebut dibandingkan dengan nilai standar sesuai dengan instrumen dan reagen kit yang digunakan sehingga didapatkan nilai untuk mengevaluasi pengerjaan proses sekuensing. Menurut Kastanis et al. (2019) dalam percobaannya menggunakan lima instrumen *miseq sequencing* untuk mencari metode dan indikator penting dalam mendapatkan kualitas hasil standar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan evaluasi berdasarkan indikator penting dalam pengerjaan *whole genome* SARS CoV-2 di Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Provinsi Jawa Tengah.

## METODE

Penelitian dilakukan secara survei. Sampel didapatkan dan dikumpulkan dari beberapa laboratorium dan rumah sakit di Jawa Tengah, Jawa barat, Banten dan Jakarta untuk dilakukan observasi. Secara umum, tahapan yang dilakukan dalam mengerjakan *whole genome sequencing* meliputi pengumpulan sampel, preparasi sampel, preparasi perpustakaan DNA, sekuensing dan analisis data. Penelitian ini terdiri dari empat *batch* pengerjaan dengan jumlah sampel dalam setiap *batch* sebanyak 96 sampel. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah pada bulan Maret hingga Juli 2022.

### *Pengumpulan Sampel*

Sampel dikumpulkan dari beberapa laboratorium dan rumah sakit dari lokasi asal yang berbeda. Sampel yang didapatkan merupakan sampel positif COVID-19 dan untuk observasi lebih lanjut hingga analisis *whole genome*. Pengambilan sampel dari hasil swab nasofaring dan dihomogenkan dalam *viral transport medium* untuk disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### *Ekstraksi RNA Virus*

Ekstraksi RNA virus menggunakan *Singuway Extraction RNA Kit* dengan mesin *automatic extraction* mengikuti penelitian yang sebelumnya telah dimodifikasi (Xiong et al., 2020). Sebanyak 25 $\mu\text{l}$  larutan ilution buffer diambil dari *plate*

yang akan digunakan dengan tujuan untuk meningkatkan konsentrasi RNA hasil ekstraksi. Kemudian sebanyak 200 $\mu$ l larutan *viral transport medium* (VTM) yang berisi sampel virus hasil swab dimasukkan ke dalam *plate* sesuai kode sampel yang ditentukan. Masukkan *plate* ke dalam mesin ekstraksi dan jalankan sesuai program yang digunakan.

### Preparasi Perpustakaan DNA

Persiapan perpustakaan DNA menggunakan reagen *Illumina COVIDSeq Test* yang kemudian dilakukan beberapa modifikasi untuk dapat disesuaikan dengan kondisi dilaboratorium. Anneal RNA dilakukan dengan menyiapkan *plate PCR*. Sebanyak 8,5 $\mu$ L dimasukkan ke dalam setiap *well-plate PCR*. Tambahkan sebanyak 8,5 $\mu$ L sampel hasil ekstraksi ke dalam *well*. Tutup *plate* menggunakan *seal* dan *shake* dengan kecepatan 1,000xg selama 1 menit kemudian masukan dalam mesin PCR untuk *running*. Selanjutnya *synthesis first strain cDNA* dilakukan dengan menyiapkan *mastermix* yang berisi larutan *first strain mix* dan RVT. Sebanyak 8 $\mu$ L *mastermix* dimasukkan ke dalam *well plate* yang berisi sampel hasil anneal RNA. *Seal* dan *shake* dengan kecepatan 1.000x g selama satu menit kemudian masukan *plate* dalam mesin PCR untuk *running*. Selanjutnya yaitu *amplify DNA virus* yang dilakukan dengan membuat dua *mastermix* yang berbeda yaitu *mastermix* berisi *primer pool* versi V3 dan V4 yang dilakukan pada *batch* yang berbeda (Clark et al., 2022). Sebanyak dua *plate PCR* disiapkan untuk *mastermix* pertama dan kedua. Sebanyak 20 $\mu$ l *mastermix* dimasukkan ke dalam *well* sesuai *plate*. Tambahkan sebanyak 5 $\mu$ l sampel cDNA ke dalam *well* satu dan dua. *Seal* dan *shake* dengan kecepatan 1.000x g selama 1 menit kemudian masukan dalam mesin PCR untuk *running* (Bhoyar et al., 2021).

Langkah selanjutnya yaitu *tagmentation* yang dilakukan dengan menyiapkan *mastermix* berisi EBLTs, TB1 dan *Nuclease free water*. Campurkan hasil amplifikasi PCR *primer pool* 1 dan *primer pool* 2 masing-masing 10 $\mu$ l sesuai kode sampel pada *plate* baru. Tambahkan sebanyak 30 $\mu$ l *mastermix* kesetiap *well* yang berisi sampel. *Seal* dan *shake* dengan kecepatan 1000x g selama 1 menit. Kemudian masukan pada mesin PCR untuk *running*. Setelah PCR selesai, tambahkan sebanyak 10 $\mu$ l ST2 ke dalam setiap *well*. *Seal* dan *shake* dengan kecepatan 1000x g selama satu menit. Lakukan inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tempatkan *plate* sampel pada *magnetic stand* selama 3 menit. Buang semua *supernatant* dan lakukan pencucian menggunakan TWB sebanyak dua kali. Langkah selanjutnya yaitu *amplify tagmentation* dilakukan dengan cara menyiapkan *mastermix* yang berisi EPM HT dan *Nuclease free water*. Sebanyak 40 $\mu$ l *mastermix* dan 10 $\mu$ l index ditambahkan pada setiap sampel yang telah dicuci. *Seal* dan *shake* dengan kecepatan 1000x g selama 1 menit. Kemudian masukan *plate* ke dalam mesin PCR untuk di *running* (Bhoyar et al., 2021).

Langkah selanjutnya yaitu *pool and clean up libraries* dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 5 $\mu$ l dari setiap sampel dan dimasukkan pada mikrotube 2ml, tambahkan sebanyak 396 ITB ke dalam *tube* dan inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Letakan *tube* pada *magnetic stand* selama 3 menit. Buang semua *supernatant* lalu tambahkan 1ml ethanol 80% dan inkubasi selama 30 detik. Lakukan langkah tersebut sebanyak dua kali. Bersihkan semua sisa ethanol hingga benar-benar bersih, lalu tambahkan sebanyak 50 $\mu$ l *Resuspen buffer* ke

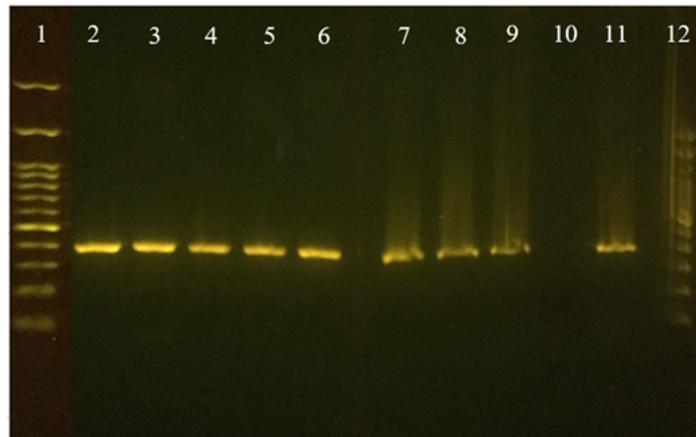
dalam *tube*. *Vortex* dan *spindown tube* kemudian inkubasi selama 2 menit. Letakan kembali *tube* pada *magnetic stand* selama 2 menit. Sebanyak 20 $\mu$ l *supernatant* diambil dan dimasukkan pada *tube* baru sebagai stok. Langkah selanjutnya yaitu normalisasi dan pengenceran dilakukan dengan cara sebanyak 2 $\mu$ l sampel dari stok diencerkan menggunakan RSB dengan hasil pengenceran 10 kali. Hasil pengenceran di lakukan *quantify* menggunakan *qubit* untuk mengetahui nilai kosentrasi. Hasil pengenceran 10 kali kemudian diencerkan kembali menjadi 4nm. Hasil pengenceran 4nm kemudian dilakukan pembukaan untai DNA hingga menjadi untai tunggal menggunakan NaOH 10%. Lakukan pengenceran hingga kosentrasi akhir yaitu 10pm untuk dimasukkan pada mesin *Illumina Miseq sequencing* (Pillay et al., 2020).

#### *Pengolahan dan Analisis Data*

Analisis data hasil penelitian dilakukan secara deskriptif. Hasil sekuensing berupa FASTQ dianalisis menggunakan program *sequencing analysis viewer* yang menghasilkan nilai *cluster density*, *passing filter* dan Q30. Data yang didapatkan kemudian dibandingkan untuk evaluasi pengerjaan yang didasarkan pada keberhasilan sequencing. Parameter keberhasilan sekuensing dalam penelitian ini yaitu didapatkannya hasil analisis *Dragen COVID lineage*.

## HASIL

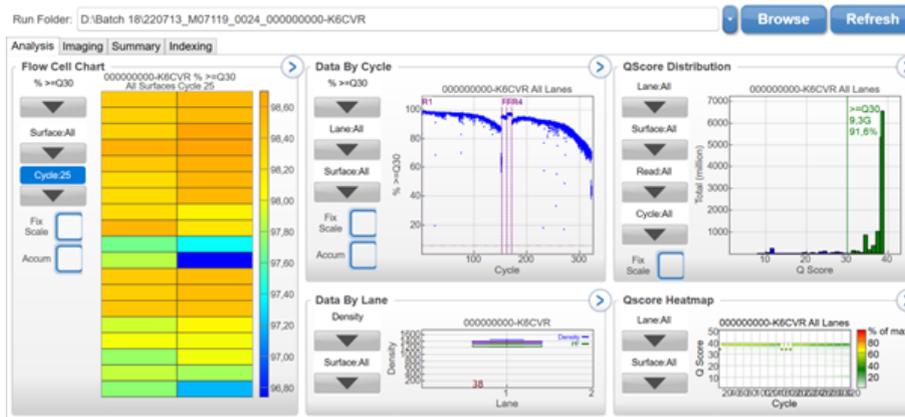
Pengerjaan *whole genome sequencing* diawali dengan proses ekstraksi RNA virus SARS CoV-2. Kemudian dilakukan amplifikasi PCR untuk proses penempelan enzim *reverse transcriptase* serta penggandaan secara invitro.



**Gambar 1**

#### Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR

No. 1 dan No. 12 DNA Marker 100bp, No. 2-9 sampel setiap *batch*, No. 10 kontrol negatif, No. 11 kontrol positif  
DOI: <https://doi.org/10.36990/hijp.v15i1.706.g734>



Gambar 2

Tampilan Hasil Analisis Sequencing Analysis Viewer (SAV) WGS Batch 18 menggunakan Instrumen Miseq  
DOI: <https://doi.org/10.36990/hijp.v15i1.706.g735>

Proses amplifikasi PCR berhasil yang ditandai dengan pita DNA hasil visualisasi gel elektroforesis dengan panjang produk 400bp. DNA marker digunakan sebagai standar untuk mengetahui panjang produk hasil amplifikasi. Visualisasi yang dilakukan pada penelitian ini diambil dari dua sampel secara acak pada setiap *batch* untuk mengetahui keberhasilan dalam mendapatkan materi genetik serta penggandaan RNA virus. Sebanyak delapan sampel visualisasi hasil PCR yang menunjukkan keberhasilan sesuai dengan kontrol positif pada *well* nomor 11 yaitu 400bp, dan kontrol negative pada *well* 10 menunjukkan hasil yang sesuai *di mana* PCR yang dilakukan tanpa materi virus (Gambar 1).

*Whole genome sequencing* dilakukan dengan empat kali *running* pada *batch* 12, 14, 17 dan 18. Dua *set primer artic* digunakan sebagai pembandingan yaitu primer versi V3 dan V4 yang digunakan pada masing-masing 2 *batch*. Primer versi V3 digunakan pada *batch* 12 dan 14 sedangkan primer versi V4 digunakan pada *batch* 17 dan 18.

Tabel 1

Jenis Primer dan Persentase Keberhasilan

Batch	Jumlah sampel	Primer pool artic	Keberhasilan (%)
12	96	V3	61
14	96	V3	73
17	96	V4	95
18	96	V4	100

DOI: <https://doi.org/10.36990/hijp.v15i1.706.g735>

Sebanyak 384 sampel dalam empat *batch* dengan masing-masing *batch* terdiri dari 96 sampel menunjukkan hasil persentase keberhasilan yang bervariasi antar *batch*. Persentase keberhasilan menunjukkan keberhasilan meningkat dari *batch* 12 hingga *batch* 18 dengan masing-masing persentase berturut-turut 61%, 73%, 95% dan 100%. Perbedaan dua *batch* pertama yaitu 12 dan 14 dengan dua *batch* terakhir yaitu 17 dan 18 pada penelitian ini diduga karena primer yang digunakan berbeda. Dua *batch* pertama, primer yang digunakan merupakan *primer pool artic* versi V3 sedangkan dua *batch* terakhir, primer yang digunakan yaitu *primer*

*pool artic* versi V4. *Primer pool artic* versi V4 menunjukkan hasil yang lebih stabil dibandingkan dengan primer *pool artic* versi V3 yang ditunjukkan dengan persentase keberhasilan yang lebih tinggi (Tabel 1).

Hasil sekuensing dilakukan analisis untuk evaluasi proses pengerjaan *whole genome sequencing*. Analisis dilakukan dengan menggunakan program *sequencing analysis viewer* (SAV) dari Illumina. Program tersebut dapat digunakan untuk melihat beberapa indikator untuk menilai hasil sekuensing.

**Tabel 2**  
Hasil Analisis WGS menggunakan SAV

Batch	Cluster density (k/mm <sup>2</sup> )	Cluster PF (%)	Q30 (%)
12	1086±25	55,10±36,69	89,29
14	1019±36	95,81±0,32	95,28
17	839±24	96,66±0,58	95,68
18	1379±32	92,88±0,57	91,84

DOI: <https://doi.org/10.36990/hijp.v15i1.706.g737>

Setiap indikator untuk melihat kualitas hasil sekuensing menunjukkan nilai yang bervariasi di setiap *batch* pengerjaan. Indikator dari *cluster density* tertinggi ditunjukkan pada *batch* 18 di mana nilai tersebut merupakan nilai yang optimal yaitu 1379±32. Nilai *cluster density* pada *batch* 12, 14 dan 17 menunjukkan nilai yang rendah (*under cluster*) yaitu 839±24-1086±25. Nilai cluster PF pada *batch* 14, 17 dan 18 menunjukkan nilai yang optimal yaitu 92,88±0,57%-96,66±0,58%. Namun pada *batch* 12 nilai yang rendah yaitu 55,10±36,69. Kemudian nilai Q30 dengan nilai optimal pada setiap *batch* yaitu 91,84%-95,68% (Tabel 2).

## PEMBAHASAN

*Whole genome sequencing* merupakan salah satu aplikasi dari *next generation sequencing* yang penggunaannya menjadi tren dalam mencari informasi genetik suatu organisme (Park & Kim, 2016). Sejak munculnya pandemi COVID-19, *whole genome sequencing* digunakan sebagai metode monitoring perubahan struktur asam nukleat seluruh gen dari SARS CoV-2. Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah salah satu pusat rujukan sekaligus tempat yang mengerjakan *whole genome* SARS CoV-2 dalam monitoring kasus COVID-19 di Jawa Tengah. Berdasarkan hasil penelitian, keberhasilan dari empat *batch* yang teliti, bahwa dua *batch* terakhir memiliki persentase keberhasilan lebih tinggi dibandingkan pada dua *batch* pertama. Hal tersebut diduga karena primer yang digunakan berbeda yaitu *primer pool artic* versi V3 dan V4. Menurut Clark et al. (2022) penggunaan jenis primer sangat mempengaruhi hasil sekuensing dari *whole genome sequencing*. Hasil penelitian tersebut merekomendasikan primer versi V4 lebih baik untuk menghasilkan *genome* SARS CoV-2 dengan konsentrasi yang rendah. Selain itu, *primer pool artic* versi V4 baik digunakan untuk studi *genome* SARS CoV-2 yang telah bermutasi.

Berbagai instrument dapat digunakan sebagai alat untuk pengurutan *genome* SARS CoV-2. Namun setiap alat yang digunakan umumnya memiliki nilai standar dari indikator yang digunakan sebagai acuan dalam melihat kualitas

hasil sekuensing. Menurut Ravi et al. (2018) analisis indikator dengan nilai ideal untuk instrument Miseq dengan reagen Miseq V3 yaitu *cluster density* 1200-1400k/mm. *Cluster PF* >85% dan >70% untuk Q30%. Nilai dari parameter tersebut berbeda jika instrument yang digunakan juga berbeda. Nilai dari indikator *cluster density* dalam penelitian ini yaitu *batch* 12, 14 dan 17 menunjukkan nilai yang tergolong *under clustering* (rendah) karena tidak mencapai nilai indikator standar. Meski demikian, *genome* yang melalui standar pada *flowcell* cukup optimal sehingga signal dalam pembacaan tetap terdeteksi dengan baik seperti pada *batch* 18 dengan nilai *cluster density* yang optimal. *Cluster passing filter* pada penelitian ini menunjukkan nilai yang ideal yaitu  $92,88 \pm 0,57 - 96,66 \pm 0,58$  kecuali pada *batch* 12 di mana nilai *passing filter* menunjukkan nilai yang rendah yaitu  $55,10 \pm 36,69$  dan jauh dibawah standar >85%. Hal tersebut dapat menjadi salah satu faktor rendahnya persentase keberhasilan dalam pengerjaan *whole genome sequencing* pada *batch* 12 (Tabel 1).

Parameter dalam WGS seperti *cluster density*, *cluster PF* dan Q30 menjadi indikator yang sangat penting untuk evaluasi proses sekuensing (Kastanis et al., 2019). *Cluster density* merupakan klaster yang dibentuk dalam *flowcell* secara klonal. Jumlah klaster yang terbentuk dipengaruhi oleh kualitas dari perpustakaan DNA dalam proses penyiapan. Penyiapan perpustakaan DNA dilakukan dengan prosedur dan ketelitian dalam pengerjaan karena tahapan ini menjadi tahapan yang sangat penting sebagai penentu kualitas hasil *whole genome sequencing* (Ravi et al., 2018). *Cluster PF* merupakan klaster yang dapat melalui filter pembacaan dan menunjukkan kemurnian klaster. Jika garis *density* berdekatan dengan garis PF maka hasil sekuensing semakin baik. Garis tersebut menunjukkan perbandingan kepadatan klaster klonal dengan klaster yang dapat melalui filter. Garis yang berdekatan menunjukkan perbandingan yang selaras dari keduanya (Kircher et al., 2012). Sedangkan Q30 merupakan intensitas signal dari pembacaan, semakin tinggi nilai Q30 maka intensitas pembacaan semakin tinggi (Kircher et al., 2012; Ravi et al., 2018). Beberapa indikator ideal ditunjukkan seperti pada Gambar 2.

Pengurutan menggunakan metode *whole genome sequencing* merupakan metode yang baik dilakukan untuk mendapatkan beberapa informasi genetik secara menyeluruh. Beberapa studi menunjukkan bahwa hasil sekuensing menggunakan metode pengurutan *whole genome sequencing* memberikan informasi yang kompleks tentang karakteristik basa nukleotida dalam rangkaian *genome*. Beberapa informasi seperti anotasi, mutasi hingga *lineage* dari SARS CoV-2 ditemukan dari hasil analisis tersebut sehingga dapat digunakan sebagai monitoring dari persebaran mutasi varian virus SARS CoV-2. Berdasarkan penelitian Umair et al., (2021) metode *whole genome sequencing* mampu mendeteksi varian G614 di beberapa wilayah di Pakistan. Penelitian lain, mengenai deteksi mutasi dan *lineage* dari SARS CoV-2 di beberapa negara berhasil dilakukan menggunakan metode *whole genome sequencing* untuk monitoring perubahan varian di Negara tersebut (Frampton et al., 2021; Martins et al., 2021).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Optimasi pengerjaan *whole genome sequencing* menggunakan *primer pool artic* V3 dan V4 menunjukkan keberhasilan lebih tinggi dengan penggunaan *primer pool artic* versi V4 seperti yang ditunjukkan pada *batch* 17 dan 18. Hasil evaluasi berdasarkan keberhasilan dan indikator penting dari percobaan ini, *primer pool* versi V4 dapat direkomendasikan sebagai primer untuk pengerjaan *whole genome sequencing* SARS CoV-2.

### *Kekurangan Penelitian*

Beberapa parameter tidak dapat diobservasi seperti kualitas sampel virus menjadi faktor lain terhadap persentase keberhasilan. Selain itu, data hasil sekuensing perlu menggunakan beberapa perangkat lunak dalam memastikan kualitas dan keberhasilan pengerjaan *whole genome sequencing*. Data yang didapatkan hanya berdasarkan dari perangkat lunak dan program yang tersedia dari Illumina.

### Mengakui

Ucapan terimakasih kepada Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhoyar, R. C., Senthivel, V., Jolly, B., Imran, M., Jain, A., Divakar, M. K., Scaria, V., & Sivasubbu, S. (2021). An optimized, amplicon-based approach for sequencing of SARS-CoV-2 from patient samples using COVIDSeq assay on Illumina MiSeq sequencing platforms. *STAR Protocols*, 2(3), 100755. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100755>
- Clark, A. C. R., Hardison, M. T., Houdeshell, H. N., Vest, A. C., & Darcy, A. (2022). *Evaluation of an optimized protocol and Illumina ARTIC V4 primer pool for sequencing of SARS-CoV-2 using COVIDSeq™ and DRAGEN™ COVID Lineage App workflow.*
- Frampton, D., Rampling, T., Cross, A., Bailey, H., Heaney, J., Byott, M., Scott, R., Sconza, R., Price, J., Margaritis, M., Bergstrom, M., Spyer, M. J., Miralhes, P. B., Grant, P., Kirk, S., Valerio, C., Mangera, Z., Prabhakar, T., Moreno-Cuesta, J., ... Nastouli, E. (2021). Genomic characteristics and clinical effect of the emergent SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage in London, UK: a whole-genome sequencing and hospital-based cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(9), 1246–1256. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00170-5)
- Gunadi, Wibawa, H., Marcellus, Hakim, M. S., Daniwijaya, E. W., Rizki, L. P., Supriyati, E., Nugrahaningsih, D. A. A., Afiahayati, Siswanto, Iskandar, K., Anggorowati, N., Kalim, A. S., Puspitarani, D. A., Athollah, K., Arguni, E., Nuryastuti, T., & Wibawa, T. (2020). Full-length genome characterization and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 virus strains from Yogyakarta and Central Java, Indonesia. *PeerJ*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.10575>
- Kastanis, G. J., Santana-Quintero, L. V., Sanchez-Leon, M., Lomonaco, S., Brown, E. W., & Allard, M. W. (2019). In-depth comparative analysis of Illumina® MiSeq

- run metrics: Development of a wet-lab quality assessment tool. *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 377–387. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12973>
- Kircher, M., Sawyer, S., & Meyer, M. (2012). Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 1–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr771>
- Martins, A. F., Zavascki, A. P., Wink, P. L., Volpato, F. C. Z., Monteiro, F. L., Rosset, C., De-Paris, F., Ramos, Á. K., & Barth, A. L. (2021). Detection of SARS-CoV-2 lineage P.1 in patients from a region with exponentially increasing hospitalisation rate, February 2021, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Eurosurveillance*, 26(12), 0–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.12.2100276>
- Massi, M. N., Abidin, R. S., Farouk, A.-E., Halik, H., Soraya, G. V., Hidayah, N., Sjahril, R., Handayani, I., Hakim, M. S., Gazali, F. M., Setiawaty, V., & Wibawa, T. (2022). Full-genome sequencing and mutation analysis of SARS-CoV-2 isolated from Makassar, South Sulawesi, Indonesia. *PeerJ*, 10, e13522. <https://doi.org/10.7717/peerj.13522>
- Park, S. T., & Kim, J. (2016). Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *International Neurology Journal*, 20, 76–83. <https://doi.org/10.5213/inj.1632742.371>
- Phelan, A. L., Katz, R., & Gostin, L. O. (2020). The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, China: Challenges for Global Health Governance. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(8), 709–710. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1097>
- Philips, V., & Wicaksono, T. Y. (2020). Karakter dan Persebaran Covid-19 di Indonesia. *CSIS Commentaries, April*, 1–12.
- Pillay, S., Giandhari, J., Tegally, H., Wilkinson, E., Chimukangara, B., Lessells, R., Moosa, Y., Mattison, S., Gazy, I., Fish, M., Singh, L., Khanyile, K. S., San, J. E., Fonseca, V., Giovanetti, M., Alcantara, L. C. J., & de Oliveira, T. (2020). Whole genome sequencing of sars-cov-2: Adapting illumina protocols for quick and accurate outbreak investigation during a pandemic. *Genes*, 11(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/genes11080949>
- Ravi, R. K., Walton, K., & Khosroheidari, M. (2018). Miseq: A next generation sequencing platform for genomic analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1706, 223–232. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12)
- Turista, D. D. R., Islamy, A., Kharisma, V. D., & Ansori, A. N. M. (2020). Distribution of COVID-19 and phylogenetic tree construction of sars-CoV-2 in Indonesia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(May), 1035–1042. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.SPL1.42>
- Umair, M., Ikram, A., Salman, M., Khurshid, A., Alam, M., Badar, N., Suleman, R., Tahir, F., Sharif, S., Montgomery, J., Whitmer, S., & Klana, J. (2021). Whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 reveals the detection of G614 variant in Pakistan. *PLoS ONE*, 16(3 March), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248371>
- Xiong, D., Dai, W., Gong, J., Li, G., Liu, N., Wu, W., Pan, J., Chen, C., Jiao, Y., Deng, H., Ye, J., Zhang, X., Huang, H., Li, Q., Xue, L., Zhang, X., & Tang, G. (2020). Rapid detection of SARS-CoV-2 with CRISPRCas12a. *PLoS Biology*, 18(12 December), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000978>

## **Catatan kaki**

**Editor Akademis:** Arli Aditya Parikesit (Indonesia International Institute for Life Sciences, INDONESIA).

**Pernyataan Konflik Kepentingan:** Para penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dengan pihak manapun.

**Kontribusi Penulis:** **YH** (Konseptualisasi, Metodologi); **MN** (Kurasi data, Visualisasi, Penyiapan naskah - draft, Penyiapan naskah - revidi & pengeditan); **EW** (Investigasi); **DAKH** (Investigasi); **P** (Investigasi); **M** (Investigasi); **HS** (Investigasi); **IF** (Analisis formal); **SH** (Analisis formal); **WP** (Analisis formal).

**Berbagi Data:** Data penelitian tersedia melalui korespondensi dengan penulis.

**Pernyataan Penerbit:** Poltekkes Kemenkes Kendari menyatakan tetap netral sehubungan dengan klaim dari perspektif atau buah pikiran yang diterbitkan.

## **Author notes**

m.nurhafid15@gmail.com