

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

### ABSTRAK

SARS CoV-2 merupakan virus yang menyebar hampir keseluruhan 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 survey digunakan dalam penelitian ini dimana sampel diambil dari beberapa daerah yaitu Jawa tengah, Jawa Barat, Banten dan Jakarta. Analisis keberhasilan didasarkan pada hasil fasta dari analisis Dragon 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 dimana 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 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 Dragon 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 Covid19 sebagai keadaan darurat kesehatan masyarakat. Di Indonesia, kasus covid19 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 suatu dari organisme 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 Whole Genome Sequencing berhasil dilakukan sebagai studi mengenai genome virus SARS CoV-2 untuk melihat mutasi, mapping persebaran hingga deteksi beberapa varian baru (Gunadi et al., 2020; Massi et al., 2022). Di Indonesia, metode whole genome sequencing masih sangat jarang sekali dilakukan. Hal tersebut karena metode whole genome sequencing ini masih sangat baru dan masih kurang dipahami oleh sebagian besar peneliti. Selain itu metode whole genome sequencing dianggap rumit dalam proses pengerjaan sehingga artikel ini sangat penting untuk dipublikasikan untuk memberikan gambaran dan pengetahuan mengenai indikator-indikator penting sebagai acuan dalam pengerjaan whole genome sequencing.

Pengembangan dan perbaikan metode whole genome sequencing perlu dilakukan guna untuk 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 PCR dan sekuensing. Selain itu, untuk mengevaluasi hasil sekuensing ada beberapa indikator penting yang dapat diterapkan untuk menggambarkan kualitas dari hasil pengerjaan whole genome sequencing 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 untuk mendapatkan kualitas hasil yang bagus. Beberapa indikator tersebut yaitu cluster density, passing filter dan Q30. 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 survey. 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.

#### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan Provinsi Jawa Tengah pada bulan Maret hingga Juli 2022

#### Pengumpulan Sampel

## ORIGINAL RESEARCH

Sampel dikumpulkan dari beberapa laboratorium dan rumah sakit dari lokasi asal yang berbeda. Sampel didapatkan merupakan sampel yang telah diketahui positif covid19 sehingga sampel dikumpulkan untuk observasi lebih lanjut hingga analisis whole genome. Sampel diambil dari hasil swab nasofaring dan dihomogenkan dalam viral transport medium untuk disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Ekstraksi RNA Virus

Ekstraksi RNA virus dilakukan menggunakan Extraction RNA kit (Singuway) dengan mesin extraction otomatis mengikuti penelitian yang sebelumnya telah dimodifikasi (Xiong et al., 2020). Sebanyak  $25\mu\text{l}$  larutan lution buffer diambil dari plate yang akan digunakan dengan tujuan untuk meningkatkan konsentrasi RNA hasil ekstraksi. Kemudian sebanyak  $200\mu\text{l}$  larutan viral transport medium (VTM) yang berisi sampel virus hasil swab dimasukan kedalam plate sesuai kode sampel yang ditentukan. Masukan plate kedalam mesin ekstraksi dan jalankan sesuai program yang digunakan.

### Library Preparation

Library preparation dilakukan menggunakan reagen covidseq test dari diillumina yang kemudian dilakukan beberapa modifikasi untuk dapat disesuaikan dengan kondisi dilaboratorium. Anneal RNA dilakukan dengan menyiapkan plate PCR. Sebanyak  $8,5\mu\text{L}$  dimasukan kedalam setiap well-plate PCR. Tambahkan sebanyak  $8,5\mu\text{L}$  sampel hasil ekstraksi kedalam well. Tutup plate menggunakan seal dan shake dengan kecepatan  $1,000\times\text{g}$  selama 1 menit kemudian masukan dalam mesin PCR untuk running. Selanjutnya synthesis first strain cDNA dilakukan menyiapkan mastermix yang berisi larutan first strain mix dan RVT. Sebanyak  $8\mu\text{L}$  mastermix dimasukan kedalam well plate yang berisi sampel hasil anneal RNA. Seal dan shake dengan kecepatan  $1.000\times\text{g}$  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 masermix 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  $20\mu\text{l}$  mastermix dimasukan kedalam well sesuai plate. Tambahkan sebanyak  $5\mu\text{l}$  sampel cDNA kedalam well satu dan dua. Seal dan shake dengan kecepatan  $1.000\times\text{g}$  selama 1 menit kemudian masukan dalam mesin PCR untuk running (Bhoyar et al., 2021).

Langkah selanjutnya yaitu tagmentation yang dilakukan dengan menyiapkan mastermix yang berisi EBLTs, TB1 dan Nuclease free water. Campurkan hasil amplifikasi PCR primer pool 1 dan primer pool 2 masing-masing  $10\mu\text{l}$  sesuai kode sampel pada plate baru. Tambahkan sebanyak  $30\mu\text{l}$  mastermix kesetiap well yang berisi sampel. Seal dan shake dengan kecepatan  $1000\times\text{g}$  selama 1 menit. Kemudian masukan pada mesin PCR untuk running. Setelah PCR selesai, tambahkan sebanyak  $10\mu\text{l}$  ST2 kedalam setiap well. Seal dan shake dengan kecepatan  $1000\times\text{g}$  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  $40\mu\text{l}$  mastermix dan  $10\mu\text{l}$  index ditambahkan pada setiap sampel yang telah dicuci. Seal dan shake dengan kecepatan  $1000\times\text{g}$  selama 1 menit. Kemudian masukan plate kedalam mesin PCR untuk di running (Bhoyar et al., 2021).

Langkah selanjutnya yaitu pool and clean up libraries dilakukan dengan cara mengambil sebanyak  $5\mu\text{l}$  dari setiap sampel dan dimasukan pada mikrotube  $2\text{ml}$ . tambahkan sebanyak  $396\text{ ITB}$  kedalam tube dan inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Letakan tube pada magnetic stand selama 3 menit. Buang semua supernatant lalu tambahkan  $1\text{ml}$  ethanol  $80\%$  dan inkubasi selama 30 detik. Lakukan langkah tersebut sebanyak dua kali. Bersihkan semua sisa ethanol hingga benar-benar bersih, lalu tambahkan sebanyak  $50\mu\text{l}$  Resuspen buffer kedalam tube. Vortex dan spindown tube kemudian inkubasi selama 2 menit. Letakan kembali tube pada magnetic stand selama 2 menit. Sebanyak  $20\mu\text{l}$  supernatant diambil dan dimasukan pada tube baru sebagai stok. Langkah selanjutnya yaitu normalisasi dan pengenceran dilakukan dengan cara sebanyak  $2\mu\text{l}$  sampel dari stok diencerkan menggunakan RSB dengan hasil pengenceran 10 kali. Hasil pengenceran di lakukan quantify menggunakan qubit untuk mengetahui nilai konsentrasi. Hasil pengenceran 10 kali kemudian

## ORIGINAL RESEARCH

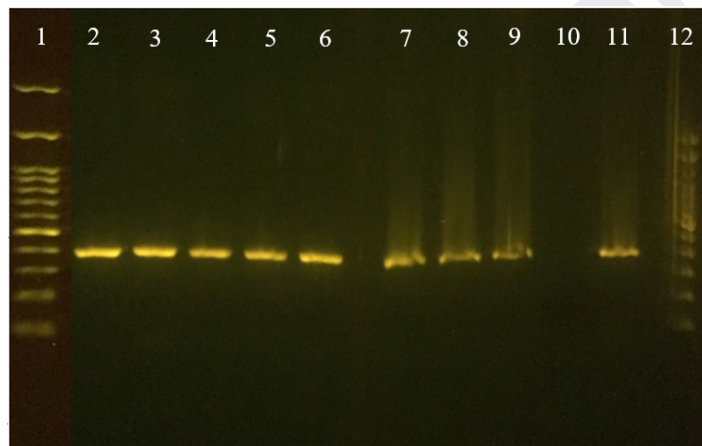
diencerkan kembali menjadi 4nm. Hasil pengenceran 4nm kemudian dilakukan pembukaan untai DNA hingga menjadi untai tunggal menggunakan NaOH 10%. Lakukan pengenceran hingga konsentrasi akhir yaitu 10pm untuk dimasukkan pada mesin Illumina Miseq sequencing (Pillay et al., 2020).

### Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data hasil penelitian dilakukan secara deskriptif. Data output 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 fasta hasil analisis Dragon covid lineage.

## HASIL

Pengerjaan whole genome sequencing diawali dengan proses ekstraksi RNA virus SARS CoV-2. Hasil ekstraksi kemudian dilakukan proses amplifikasi PCR untuk proses penempelan enzim reverse transcriptase serta penggandaan secara invitro. Hasil amplifikasi PCR ditunjukkan pada gambar 1.



**Gambar 1.** Visualisasi hasil amplifikasi PCR

Keterangan: No. 1 dan 12 DNA Marker 100bp, No. 2-9 sampel setiap batch, No. 10 kontrol negatif, No. 11 kontrol positif

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa 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 sebanyak dua sampel secara acak dari setiap batch untuk mengetahui keberhasilan dalam mendapatkan materi genetik serta penggandaan RNA virus. Sebanyak delapan sampel dilakukan visualisasi hasil PCR menunjukkan berhasil yang sesuai dengan kontrol positif pada well nomor 11 yaitu 400bp. Kemudian kontrol negative pada well 10 menunjukkan hasil yang sesuai dimana PCR yang dilakukan tanpa materi virus.

Whole genome sequencing dilakukan dengan empat kali running yaitu batch 12, 14, 17 dan 18. Dua set primer artic digunakan untuk dibandingkan yaitu primer versi V3 dan V4 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. Jenis primer dan persentase keberhasilan pengerjaan whole genome sequencing ditampilkan pada **Tabel 1**.

**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

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.

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. Analisis data hasil sekuensing pada penelitian ini ditampilkan dalam **Tabel 2**

**Tabel 2.** Hasil analisis Whole Genome Sequencing 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

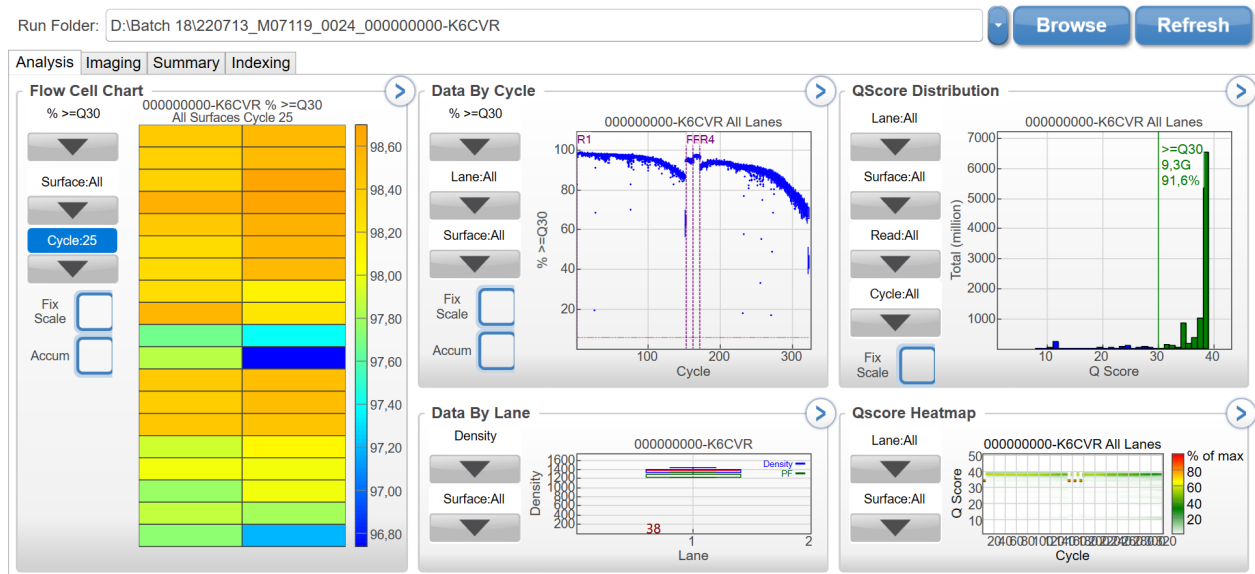
Berdasarkan data diatas, setiap indikator untuk melihat kualitas hasil sekuensing menunjukkan nilai yang bervariasi di setiap batch pengerjaan. Indikator dari cluster density tertinggi ditunjukkan pada batch 18 dimana nilai tersebut merupakan nilai yang optimal yaitu 1379±32. Nilai cluster density pada 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 menunjukkan nilai yang rendah yaitu 55,10±36,69. Kemudian nilai Q30 menunjukkan nilai optimal pada setiap batch yaitu 91,84%-95,68%.

## PEMBAHASAN

Whole genome sequencing merupakan salah satu aplikasi dari next generation sequencing yang paling tren digunakan dalam menggali informasi genetik suatu organisme (Park & Kim, 2016). Sejak munculnya pandemi Covid19, whole genome sequencing digunakan sebagai metode monitoring perubahan struktur asam nukleat seluruh gen dari SARS CoV-2 di beberapa Negara di dunia termasuk Indonesia. 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 covid19 di Jawa Tengah. Berdasarkan hasil penelitian keberhasilan dari empat batch yang dilakukan menunjukkan 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<sup>2</sup>, 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 lolos pada flowcell cukup optimal sehingga sinyal dalam pembacaan tetap terdeteksi dengan baik seperti seperti pada batch 18 dengan nilai cluster density yang optimal. Cluster PF (passing filter) pada penelitian ini menunjukkan nilai yang ideal yaitu  $92,88 \pm 0,57$ - $96,66 \pm 0,58$  kecuali pada batch 12 dimana nilai passing filter menunjukkan nilai yang rendah yaitu  $55,10 \pm 36,69$ . Nilai tersebut memiliki rendan yang jauh dibawah nilai standar yaitu  $>85\%$ . Hal tersebut dapat menjadi salah satu faktor rendahnya persentase keberhasilan dalam pengerjaan whole genome sequencing pada batch 12 (Tabel1).



**Gambar 1.** Tampilan analisis sequencing analysis viewer (SAV) hasil whole genome sequencing Batch 18 menggunakan instrument Miseq dengan nilai cluster density, cluster PF dan Q30 sebagai data yang ideal.

Parameter dalam sekuensing whole genome seperti cluster density, cluster PF dan Q30 menjadi indikator yang sangat penting untuk evaluasi proses sekuensing (Kastanis et al., 2019). Cluster density merupakan kluster yang dibentuk dalam flowcell secara klonal. Jumlah kluster yang terbentuk dipengaruhi oleh kualitas dari DNA libraries dalam proses library preparation. Library preparation harus 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 kluster yang berhasil lolos pada filter pembacaan dan menunjukkan kemurnian kluster. Jika garis density dengan berdekatan dengan garis PF maka hasil sekuensing semakin baik. Garis tersebut menunjukkan perbandingan kepadatan kluster klonal dengan kluster yang lolos pada filter. Garis yang berdekatan menunjukkan perbandingan yang selaras dari keduanya (Kircher et al., 2012). Sedangkan Q30 merupakan intensitas sinyal 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 1**.

Pengurutan menggunakan metode whole genome sequencing merupakan metode yang baik dilakukan untuk mendapatkan beberapa informasi genetik secara menyeluruh dari organisme. Beberapa studi menunjukkan bahwa hasil sekuensing menggunakan metode pengurutan whole genome sequencing mampu didapatkan informasi yang kompleks mengenai karakteristik basa nukleotida dalam rangkaian genome. Beberapa informasi seperti anotasi, mutasi hingga lineage dari SARS CoV-2 dapat ditemukan dari hasil analisis tersebut sehingga dapat digunakan sebagai monitoring dari persebaran dan perubahan dari varian. 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

## ORIGINAL RESEARCH

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 di Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Provonsi Jawa Tengah.

## KEKURANGAN KAJIAN

Penelitian ini hanya sebatas analisis sederhana. Beberapa parameter tidak dapat diobservasi seperti kualitas sampel virus yang mungkin menjadi faktor lain dari persentase keberhasilan. Selain itu, data hasil sekuensing perlu menggunakan beberapa software untuk memastikan kualitas dan keberhasilan dalam pengerjaan Whole Genome Sequencing. Data yang didapatkan hanya berdasarkan software dan program yang disediakan dari Illumina.

## 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>

## ORIGINAL RESEARCH

- 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 Neurourology 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., & Klena, 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>