

DISERTASI

**PEMERIKSAAN SISTEMATIK MORFOLOGI,
*METAPHASE KARYOTYPES, CROSSING
EXPERIMENT, DAN MOLEKULER*
NYAMUK VEKTOR MALARIA
*ANOPHELES VAGUS DAN ANOPHELES LIMOSUS***

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat guna memperoleh gelar
Doktor Ilmu Sains Biomedis



DALILAH

04013622126011

**PROGRAM STUDI SAINS BIOMEDIS
PROGRAM DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

**PEMERIKSAAN SISTEMATIK MORFOLOGI, *METAPHASE*
KARYOTYPES, *CROSSING EXPERIMENT*, DAN
MOLEKULER NYAMUK VEKTOR MALARIA
ANOPHELES VAGUS DAN *ANOPHELES LIMOSUS***

LAPORAN AKHIR DISERTASI

Diajukan Untuk Melengkapi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Doktor Ilmu Sains Biomedis

Oleh:

DALILAH

04013622126011

Palembang, 31 Juli 2024

Promotor,



Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, Ph.D
NIP 19531004 198303 1 002

Kopromotor I,



Prof. dr. Syafruddin, Ph.D
NIP 19600516 198601 1 002

Kopromotor II,



Prof. Dr. dr. Mgs. M. Irsan Saleh, M. Biomed
NIP 19660929 199601 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya



dr. Syarif Husin, M.S
NIP 19611209 1992031 003

HALAMAN PERSETUJUAN

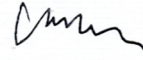
Karya tulis ilmiah berupa Disertasi ini dengan judul “Pemeriksaan Sistematis Morfologi, *Metaphase Karyotypes*, *Crossing Experiment* Dan Molekuler Nyamuk Vektor Malaria *Anopheles vagus* dan *Anopheles limosus*” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Program Studi Doktor Sains Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya pada tanggal **31 Juli 2024**.

Palembang, 31 Juli 2024

Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah berupa Disertasi

Ketua:

Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, Sp.ParK, Ph.D
NIP 19531004 198303 1 002



Anggota:

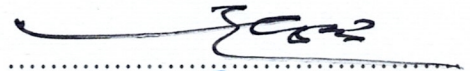
Prof. dr. Syafruddin, Ph.D
NIP 19600516 198601 1 002



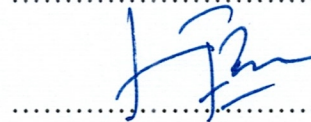
Prof. Dr. dr. Mgs. M. Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 19660929 199601 1 001



Prof. drh. Upik Kesumawati Hadi, MS, Ph.D
NIDN 0023105808



Prof. Hermansyah, S.Si, M.Si, Ph.D
NIP 19711119 199702 1 001



Dr. dr. Zen Hafy, M. Biomed
NIP 19721229 199803 1 002



Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran



dr. Syarif Husin, M.S
NIP 19611209 199203 1 003

Wakil Dekan Bidang Akademik



Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked
NIP 19730613 199903 1 001

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : dr. Dalilah, M. Kes

NIM : 04013622126011

Judul : Pemeriksaan Sistematik Morfologi, *Metaphase Karyotypes*,
Crossing Experiment Dan Molekuler Nyamuk Vektor Malaria
Anopheles vagus dan *Anopheles limosus*

Menyatakan bahwa disertasi saya merupakan hasil karya sendiri didampingi tim pembimbing I/Promotor dan Pembimbing II/Co-Promotor I dan Pembimbing III/Co-Promotor II bukan hasil penjiplakan/plagiat. Apabila ditemukan unsur penjiplakan/plagiat dalam disertasi ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku.

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.

Palembang, 30 Juli 2024



Dalilah

ABSTRAK

Latar Belakang. *Anopheles vagus* merupakan spesies dalam pyretophorus series, bersama dengan *Anopheles limosus*. Penelitian ini bertujuan melakukan pemeriksaan morfologi, molekuler dan filogenetik nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus* dari sampel di wilayah Indonesia khususnya Sumatera Selatan untuk mengkonfirmasi apakah nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus* merupakan nyamuk *species complex*.

Metode. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif survei lapangan dan analisa laboratorium dengan pendekatan studi molekuler. Dilakukan pengambilan sampel dengan cara *Human Landing Collection*, *Resting Collection* dan *Animal Bait Collection*. Pemeriksaan molekuler dengan barcoding DNA inti dan DNA mitokondrial.

Hasil. Indeks keragaman *Anopheles spp* pada tiga desa di Wilayah Sumatera bagian Selatan berturut-turut 0,66; 0,82; dan 0,35. Pada hasil pengamatan morfologi ditemukan *An. vagus* dengan ciri panjang pita pucat pada palpi tiga kali panjang pita gelap dibawahnya, dan terdapat empat pita pucat pada bagian costa. Pemeriksaan *Karyotyping metaphase* belum dapat dilakukan karena proses kolonisasi larva yang belum berhasil dilakukan. Tidak ditemukan nyamuk *An. limosus* pada wilayah penelitian lapangan, sehingga *crossmating experiment* belum dapat dilakukan. Hasil sekuensing nyamuk *An. vagus* memperlihatkan similaritas hasil dengan marka barcoding DNA inti dan DNA mitokondrial.

Kesimpulan. Keragaman nyamuk *Anopheles* di kedua kabupaten tergolong rendah. Tidak ada beda morfologi nyamuk *An. vagus* pada penelitian ini dengan dengan kunci bergambar. Hasil sekuensing dan filogenetik menunjukkan *An. vagus* Indonesia merupakan spesies monofiletik.

Kata kunci. *An. vagus*, *An. limosus*, morfologi, filogenetik, monofiletik, dan molekuler.

Wakil Dekan Bidang Akademik

Promotor



Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked
NIP. 19730613 199903 1 002

Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, Ph.D
NIP 19531004 198303 1 002

ABSTRACT

Background. *Anopheles vagus* is a species in the pyretophorus series, along with *Anopheles limosus*. This study aims to examine the morphology, molecular and phylogenetics of the *An. vagus* and *An. limosus* samples from Indonesia, especially South Sumatra, to determine whether the *An. vagus* and *An. limosus* is a complex of mosquito species.

Method. This research was a descriptive study of field surveys and laboratory analysis with a molecular study approach. Samples were taken using the Human Landing Collection, Resting Collection and Animal Bait Collection. Molecular examination by barcoding nuclear DNA and mitochondrial DNA.

Results. *Anopheles spp* diversity index in three villages in Sothern Sumatera respectively 0.66; 0.82; and 0.35. Based on the results of morphological observations, it was found that *An. vagus* was characterized by the length of the pale band on the palpi being three times the length of the dark band below it, and there were four pale bands on the costa. Metaphase karyotyping examination cannot be carried out because the larval colonization process has not been successful. *Anopheles limosus* did not found in all the field research area, so crossmating experiments could not be carried out. Sequencing results of mosquito *An. vagus* have showed similar results with nuclear DNA and mitochondrial DNA barcoding markers.

Conclusion. The diversity of *Anopheles* mosquitoes in both districts was low. There was no difference in the morphology of *An. vagus* in this study with illustrated keys. Sequencing and phylogenetic results show that *An. vagus* is a monophyletic species.

Keywords. *An. vagus*, *An. limosus*, morphology, phylogenetic, monophyletic, and molecular.

Wakil Dekan Bidang Akademik

Promotor



Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked
NIP. 19730613 199903 1 002

Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, Ph.D
NIP 19531004 198303 1 002

RINGKASAN

PEMERIKSAAN SISTEMATIK MORFOLOGI, *METAPHASE KARYOTYPES*, *CROSSING EXPERIMENT*, DAN MOLEKULER NYAMUK VEKTOR MALARIA *ANOPHELES VAGUS* DAN *ANOPHELES LIMOSUS*

Karya tulis ilmiah berupa Disertasi, 20 Juli 2024

Dalilah; dibimbing oleh promotor Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, Ph.D, co.promotor I Prof. dr. Syafruddin, Ph.D dan co.promotor II Prof. Dr. dr. Irsan Saleh, M.Biomed

Sains Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
xxvi + 160 halaman, 11 tabel, 29 gambar, 11 lampiran

RINGKASAN

Indonesia merupakan negara di Asia Tenggara yang masih berstatus endemis malaria. Literatur review sebagai studi pendahuluan mendapati bahwa *An. vagus* sebagai vektor malaria di Sumatera Bagian Selatan. Literatur review juga mendapati *Anopheles vagus* berdasarkan marka nDNA ITS2 menunjukkan kekerabatan sebagai spesies monofiletik dan bersama *An. limosus* bersifat *conspesific species* (sejenis) meskipun karakteristik morfologinya berbeda. Penelitian ini bertujuan melihat keragaman nyamuk di wilayah endemis malaria di Provinsi Sumatera Selatan dan Lampung, menganalisis dan memeriksa kembali hasil morfologi, molekuler dan filogenetik nyamuk *An.vagus* dan *An. limosus* di wilayah Indonesia serta sebagai tambahan, pemeriksaan *karyotyping metaphase* dan *crossmating experiment* sehingga didapat kesimpulan nyamuk *An.vagus* merupakan nyamuk spesies monofiletik atau telah menjadi salah satu *species complex*.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif survei lapangan dan analisa laboratorium dengan pendekatan studi molekuler. Pengambilan sampel dilakukan pada Bulan Mei-Agustus 2023. Lokasi pengambilan sampel lapangan di Desa Pulau Panggung dan Desa Muara Emil Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Desa Gayau-Durian Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung. Sampel molekuler menggunakan bahan berupa isolat DNA dan nyamuk utuh *An. vagus* yang berasal dari Sumatera Selatan, Lampung, Sumatera Barat, Sulawesi Selatan, dan Jawa Timur. Total sampel untuk pemeriksaan molekuler berasal dari lima provinsi.

Penangkapan nyamuk dilakukan pukul 18.00–06.00 WIB. Penangkapan dilakukan dengan menggunakan aspirator dengan metode yaitu: *Human Landing Collection* (HLC), *Cattle Bait Collection* (CBC), dan *Resting Collection* (RC). Larva dikumpulkan di habitat tempat perkembangbiakan. Pemeriksaan morfologi dilakukan dibawah mikroskop dan diperiksa dengan kunci bergambar *Anopheles*. Kolonisasi dan *rearing* dilakukan mendapatkan keturunan F1 yang akan digunakan

pada pemeriksaan *karyotyping metaphase* nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus*. Keturunan F1 juga akan digunakan untuk pemeriksaan *crossmating experiment* nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus*. Isolat DNA diekstraksi menggunakan Qiagen kit®. Pada pemeriksaan molekuler digunakan tiga pasang primer yang merupakan marka spesies yaitu nDNA ITS2, mtDNA COI dan mtDNA ND6 yang didesain spesifik untuk penelitian ini. Analisis sekuensing dilakukan dengan metode Sanger, dan analisis pohon filogenetik dilakukan dengan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap replicate* 1000x dan nilai *bootstrap* 70%.

Hasil penelitian menunjukkan indeks keragaman nyamuk *Anopheles* di dua Kabupaten berturut-turut 0,66; 0,82; dan 0,35. Pada pengamatan morfologi nyamuk sampel ditemukan *An. vagus* dengan ciri panjang pita pucat pada palpi tiga kali panjang pita gelap dibawahnya dan terdapat empat pita pucat pada bagian kosta. Belum berhasil dilakukan kolonisasi dan *rearing* pada nyamuk *An. vagus* sehingga pemeriksaan *karyotyping* belum bisa dilakukan pada penelitian ini. Belum ditemukan nyamuk *An. limosus* pada seluruh survei sampel lapangan sehingga *crossmating experiment* belum bisa dilakukan. Hasil sekuensing nyamuk *An. vagus* sampel dari Indonesia memperlihatkan similaritas sebesar 98.26-100% dengan marka mtDNA COI sedangkan pada marka dengan nDNA ITS2 memperlihatkan similaritas 99-100%, dan dengan mtDNA ND6 similaritas 100%. Hasil filogenetik ditemukan dua kelompok *An. vagus* dengan marka mtDNA COI *distance* 0.00-0.02 dan satu kelompok besar pada marka nDNA ITS2 dan mtDNA ND6 dengan *distance* 0.00-0.01.

Hasil keragaman ditemukan nyamuk genus *Anopheles* di kedua kabupaten tergolong rendah. Morfologi nyamuk *An. vagus* yang ditemukan pada sampel lapangan tidak memiliki perbedaan dengan kunci bergambar. Pemeriksaan sekuensing dengan marka nDNA ITS2 dan mtDNA ND6 ditemukan variasi yang sangat minimal dengan tingkat similiritas 99-100% pada nyamuk sampel. Meskipun pada pemeriksaan hasil sekuensing dengan mtDNA COI mendapatkan polimorfisme atau variasi lebih tinggi dari marka lainnya dengan tingkat similaritas sebesar 98% pada sampel dari Sumatera Barat, dan pada filogenetik berada pada kelompok yang berbeda, namun dengan *distance* yang rendah yakni 0.01-0.02 lebih menunjukkan adanya variasi intraspesifik. Sehingga disimpulkan *An. vagus* dengan marka nDNA ITS2, mtDNA COI, dan mtDNA ND6 menunjukkan *An. vagus* Indonesia merupakan spesies monofiletik.

Kata Kunci. *An. vagus*, *An. limosus*, *morphology*, *metaphase karyotypes*, *crossing experiment*, dan molekuler.

Kepustakaan. 181

SUMMARY

SYSTEMATIC EXAMINATION OF MORPHOLOGY, KARYOTYPE METAPHASE, CROSSING EXPERIMENT, AND MOLECULAR MALARIA VECTOR *ANOPHELES VAGUS* AND *ANOPHELES LIMOSUS*

Scientific Paper in the form of Dissertation, July 20th, 2024

Dalilah; supervised by promotor Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, Ph.D, co.promotor I Prof. dr. Syafruddin, Ph.D and co.promotor II Prof. Dr. dr. Irsan Saleh, M. Biomed

Biomedical Science, Faculty of Medicine, Sriwijaya University
xxvi + 160 pages, 11 tables, 29 pictures, 11 attachments

SUMMARY

Indonesia is a country in Southeast Asia that still has malaria. The literature review as a preliminary study found that *An. vagus* as a malaria vector in Southern Sumatra and also *Anopheles vagus* based on the ITS2 nDNA marker shows a relationship as a monophyletic species and with *An. limosus* is a conspecific species even though morphologically different. This research aims to identify the diversity of mosquitoes in malaria endemic areas in South Sumatra and Lampung Provinces, re-examine and analyze the morphological, molecular and phylogenetic results of the *An. vagus* and *An. limosus* in Indonesia, and in addition, examination of metaphase karyotyping and crossmating experiments to obtain the conclusion whether *An. vagus* is a monophyletic species or has become one of the species complex.

This research was a descriptive study of field surveys and laboratory analysis with a molecular study approach. Sampling was carried out in May-August 2023. Field sampling locations were in Pulau Panggung Village and Muara Emil Village, Muara Enim Regency, South Sumatra Province and Gayau-Durian Village, Pesawaran Regency, Lampung Province. Molecular samples used specimen of DNA isolates and intact mosquitoes *An. vagus* originating from South Sumatra, Lampung, West Sumatra, South Sulawesi and East Java. The total samples for molecular examination came from five provinces.

Mosquito caught at 18.00–06.00 WIB with aspirator using three methods namely: Human Landing Collection (HLC), Cattle Bait Collection (CBC), and Resting Collection (RC). The larvae were collected in the breeding habitat. Morphological examination was carried out under a microscope and examined with an *Anopheles* key. Colonization and rearing were carried out to obtain F1 offspring which will be used in the metaphase karyotyping examination of *An. vagus* and *An. limosus*. The F1 offspring will also be used to examine crossmating experiments for *An. vagus* and *An. limosus*. DNA isolates were extracted using Qiagen kit®. In the molecular examination, three pairs of primers were used which are species markers, namely nDNA ITS2, mtDNA COI and mtDNA ND6 which were specifically designed for this research. Sequencing was carried out using the Sanger method, and

phylogenetic tree analysis was carried out using the Neighbor-Joining method with bootstrap replicate 1000x and a bootstrap value of 70%.

The specific diversity index for the genus *Anopheles* in two districts respectively is 0.66; 0.82; and 0.35. When observing the morphology of the sample mosquito, it was found that *An. vagus* was characterized by the length of the pale band on the palpi three times the length of the dark band below and there are four pale bands on the costa. Colonization and rearing of the *An. vagus* has not been successfully, so that karyotyping examination could not be carried out in this study. *Anopheles limosus* has not been found in all field sample surveys so that crossmating experiments cannot be done. Sequencing results of mosquito *An. vagus* samples from Indonesia showed a similarity of 98.26-100% with the mtDNA COI, while with nDNA ITS2 showed a similarity of 99-100%, and with mtDNA ND6 a similarity of 100%. Phylogenetic results found two groups of *An. vagus* with mtDNA marker COI with distance range in 0.00-0.02. The distance with marker nDNA ITS2 and mtDNA ND6 range in 0.00-0.01, and divided in one large group for all sample.

The diversity of mosquitoes of the *Anopheles* genus in both districts is relatively low. *Anopheles vagus* found in the field samples did not differ from the pictured key. Sequencing examination with nDNA ITS2 and mtDNA ND6 markers found very minimal variations with a similarity level of 99-100% in the sample mosquitoes. Even though when examining the sequencing results with mtDNA COI, polymorphism or variation was higher than other markers with a similarity level of 98% in samples from West Sumatra, and phylogenetically it was in a different group, but with a low distance of 0.01-0.02, it was more indicative of its presence intraspecific variation. So it can be concluded that *An. vagus* with nDNA ITS2, mtDNA COI, and mtDNA ND6 markers showing *An. vagus* in Indonesia is a monophyletic species.

Keywords. *An. vagus*, *An. limosus*, morphology, metaphase karyotypes, crossing experiment, and molecular.

Citations. 181

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Allah SWT karena dengan Ketetapan-Nya, karya Disertasi yang berjudul “Pemeriksaan Sistematis Morfologi, *Metaphase Karyotypes*, *Crossing Experiment* Dan Molekuler Nyamuk Vektor Malaria *Anopheles vagus* dan *Anopheles limosus*” dapat diselesaikan. Karya tulis ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor sains biomedis (Dr.) pada Program Studi Doktor Sains Biomedis, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Penulis menyadari penyusunan karya tulis ini melibatkan segala doa, bimbingan, saran serta semangat dari berbagai pihak. Maka dari itu, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, Ph.D sebagai Promotor
2. Prof. dr. Syafruddin, Ph.D sebagai Co Promotor I
3. Prof. Dr.dr. Irsan Saleh, M. Biomed sebagai Co Promotor II

Dan juga penulis ucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. drh. Upik Kesumawati Hadi, MS, Ph.D sebagai Penguji Eksternal
2. Prof. Hermansyah, S.Si, M.Si. Ph.D sebagai Penguji Internal I
3. Dr.dr. Zen Hafy, M.Biomed sebagai Penguji Internal II

Atas saran, masukkan, koreksi dan penyempurnaan penulisan agar Disertasi ini menjadi lengkap runut, dan ber “isi”.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang membantu penelitian ini baik sampling lapangan maupun proses laboratorium molekuler:

1. Prof. Dr.rer nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. yang bersedia meluangkan waktunya dalam berkorespondensi dan memberi *insight* dan bantuan penelitian lapangan.
2. Laboratorium Entomologi dan Kesehatan Labkesmas Baturaja: Bapak Irpan Pahlepi SST, M.Si, Yahya, SKM, M.Si dan Ibu Sulfa Esi Warni, S.Si.MBiomed.
3. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan dan Propinsi Lampung: Didid Haryanto, S.Si.M.Kes dan Bapak Dody Setiawan, S.Si, M.Kes

4. Kepala Laboratorium Bioteknologi, dr. Soilia Fertilita M.Imun dan Staf laboratorium: Ibu Maisa Pusrita S.ST dan Ibu Laili Wardhani ST
5. Ibu Lepa Syahrani M.Si dari Pusat Riset Biologi Molekuler Eijkman, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), dan Irdayanti, S.Si dari Laboratorium Malaria dan Resistensi Vektor. LPPM Universitas Hasanuddin, Makassar.
6. Parasit *Squad*: dr. Dwi Handayani, M.Kes, dr. Susilawati, M.Kes, dr. Gita Dwi Prasasty, M.Biomed, dan Gustrini, Amd

Penulis sampaikan terimakasih yang tak terhingga kepada Keluarga Besar: Papa Azhari Abdullah, Mama Kartini, Ayah Chairil Anwar, dan Ibu Hajiratun Toyyiba, Anak-anakku Suri Hatila Annajwa dan Shayma Nur Khayyara, Kakak-kakak: Kasuari, Ibeng, Panhar dan Ghiffari; Ayuk-Ayuk: Moresi, Rusnelly, Nur Azmi dan Mukhsinin, serta adik-adik penulis: Yunika, Gameyoto, Meta Sakina dan Raden Ismail Hadyatma yang selalu mendoakan dan mendukung penulis menyelesaikan pendidikan dan penulisan Disertasi ini.

Teruntuk suami tercinta Abang Saifuzzuhri, terima kasih atas kesabaran, dukungan, ridho dan doanya, disetiap aktivitas penulis dalam bekerja, sekolah, dan penelitian hingga selesainya Disertasi ini dibuat.

Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang juga telah membantu penulisan disertasi ini. Pada akhirnya, penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam ilmu dan penulisan, namun dibalik kekurangan ini, penulis berharap semoga Disertasi ini dapat menjadi salah satu referensi ilmu bagi institusi dan masyarakat.

Palembang, 31 Juli 2024

Penulis,



Dalilah

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dalilah

NIM : 04013622126011

Judul : Pemeriksaan Sistematik Morfologi, *Metaphase Karyotypes*,
Crossing Experiment dan Molekuler Nyamuk Vektor Malaria
Anopheles vagus dan *Anopheles limosus*

Memberikan izin kepada Promotor/Co Promotor dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya untuk kepentingan akademik apabila dalam waktu 1 (satu) tahun tidak mempublikasikan karya penelitian saya. Dalam kasus ini saya setuju untuk menempatkan Promotor/Co Promotor sebagai penulis korespodensi (*Corresponding author*).

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.

Palembang, 20 Juli 2024



Dalilah

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
RINGKASAN	vii
KATA PENGANTAR	xi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	2
1.1 Latar Belakang	2
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Kebaruan Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	2
2.1 Malaria.....	2
2.1.1 Siklus Hidup Plasmodium.....	8
2.1.2 Diagnosis Malaria	9
2.1.3 Pengobatan Malaria.....	11
2.1.4 Pencegahan.....	11
2.2 Nyamuk <i>Anopheles spp</i>	12
2.2.1 Taksonomi Nyamuk <i>Anopheles spp</i>	12
2.2.2 Morfologi dan Siklus Hidup Nyamuk <i>Anopheles spp</i>	14
2.2.3 Bionomik Nyamuk <i>Anopheles spp</i>	15

2.2.4	Keragaman Spesies Nyamuk <i>Anopheles spp</i> di Indonesia.....	17
2.2.5	Keragaman Nyamuk <i>Anopheles spp</i> di Sumatera Bagian Selatan..	18
2.3	Kompleks Kekerabatan <i>Anopheles spp (Anopheles Species Complexes)</i>	19
2.3.1	Teori Spesies, Spesiasi, dan Kompleks spesies	19
2.3.2	Komplek Spesies <i>Anopheles</i> di Indonesia.....	23
2.4	Nyamuk <i>Anopheles vagus</i>	27
2.4.1	Morfologi dan Bionomik <i>Anopheles vagus</i>	27
2.4.2	<i>Anopheles vagus</i> sebagai Vektor.....	28
2.5	Nyamuk <i>Anopheles limosus</i>	29
2.6	Kekerabatan <i>Anopheles vagus</i> dan <i>Anopheles limosus</i>	30
2.6.1	<i>Anopheles vagus</i> dan <i>Anopheles limosus</i> dan Bukti Keberadaan Komplek Spesies	31
2.7	Teknik Identifikasi Nyamuk <i>Anopheles Species Complexes</i>	33
2.8	Teknik Sekuensing	39
2.8.1	Marka Spesies (<i>Barcoding species</i>) pada Pemeriksaan Molekuler.	40
2.8.2	Metode Sekuensing DNA	43
2.8.3	Analisis Filogenetik	45
2.8.4	Metode Rekonstruksi Pohon Filogenetika.....	45
2.8.5	Kelompok <i>Outgroup</i> dalam Analisis Filogenetika	49
2.8.6	Menganalisis Keandalan Kelompok Pohon dan Analisis Jarak Genetik	50
2.9	Analisis Geografis dan Insiden Malaria Kabupaten Muara Enim Sumatera Selatan.....	51
2.9.1	Letak Geografis Muara Enim.....	51
2.9.2	Kondisi Fisik Wilayah	52
2.9.3	Kondisi Penularan Malaria.....	53
2.10	Analisis Geografis dan Insiden Malaria Kabupaten Pesawaran Lampung	54
2.10.1	Letak Geografis Pesawaran.....	54
2.10.2	Kondisi Fisik Wilayah	55
2.10.3	Kondisi Penularan Malaria.....	56
2.11	Kerangka Teori.....	58
BAB 3 METODE PENELITIAN.....		59
3.1	Jenis Penelitian	59

3.2	Waktu dan Tempat Pengambilan Sampel.....	59
3.3	Populasi dan Sampel	60
3.4	Kriteria Sampel.....	60
3.4.1	Kriteria Inklusi	60
3.4.2	Kriteria Eksklusi.....	60
3.5	Variabel Penelitian	60
3.6	Definisi Operasional.....	61
3.7	Prosedur dan Cara Kerja Lapangan.....	63
3.7.1	Prosedur Penangkapan Nyamuk dengan Umpan Hewan Ternak ⁶ ..	63
3.7.2	Penangkapan Nyamuk Istirahat (RC) ⁶	65
3.7.3	Penangkapan Jentik ^{6,140}	66
3.7.4	Rumus Index Diversitas untuk Keragaman Nyamuk.....	66
3.8	Prosedur Pemeriksaan Morfologi	69
3.9	Prosedur Pemeriksaan Karyotype Metaphase	69
3.10	Prosedur Uji Coba Perkawinan Silang <i>An. vagus</i> dan <i>An. limosus</i>	70
3.11	Prosedur Ekstraksi Pemeriksaan Molekuler <i>Anopheles</i>	72
3.12	Prosedur <i>Polymerase Chain Reaction</i>	73
3.12.1	Amplifikasi DNA	73
3.12.2	Prosedur Sekuensing	75
3.13	Prosedur Analisis Filogenetik	76
3.14	Teknik Concatenated DNA (menyambung DNA)	76
3.15	Kerangka Operasional	77
BAB 4	78
HASIL DAN PEMBAHASAN	78
4.1	Hasil	78
4.1.1	Keragaman Nyamuk Genus <i>Anopheles</i> di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung... 84	84
4.1.2	Bentuk Morfologi Nyamuk Spesies <i>An. vagus</i> dan <i>An. limosus</i>	86
4.1.3	Bentuk Karyotipik Metafase serta Hasil <i>Crossmating Experiment</i> Nyamuk <i>An. vagus</i> dan <i>An.limosus</i>	87
4.1.4	Sekuens Genetik Marka nDNA ITS2 dan mtDNA (COI dan ND6)89	89
4.1.5	Hubungan Kekerbatan (Filogenetik) pada Nyamuk <i>An. vagus</i> ...	108
4.2	Pembahasan	112
4.2.1	Keragaman Nyamuk yang Tertangkap di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung. 112	112

4.2.2	Keragaman Nyamuk <i>Anopheles</i> yang Tertangkap di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung.	113
4.2.3	Bentuk Morfologi Nyamuk Spesies <i>An. vagus</i> dan <i>An. limosus</i> Sumatera yang Berasal dari Kabupaten Muara Enim dan Kabupaten Pesawaran.....	115
4.2.4	Bentuk <i>Karyotype Metaphase</i> serta Hasil <i>Crossmating Experiment</i> Nyamuk <i>An. vagus</i> dan <i>An.limosus</i> dari Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung	116
4.2.5	Sekuens Genetik Marka nDNA ITS2 dan mtDNA (COI dan ND6) 117	
4.2.6	Filogenetik pada Nyamuk <i>An. vagus</i> Berdasarkan Sekuens nDNA ITS2, dan mtDNA COI dan ND6.....	118
BAB 5 SIMPULAN DAN SARAN.....		121
5.1	Simpulan.....	121
4.2	Saran.....	121
DAFTAR PUSTAKA		122
LAMPIRAN.....		140
BIODATA		160

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 <i>Anopheles</i> Sibling Complexes yang telah diberikan susunan penamaan resmi... 22	
2.2 Berbagai fitur metode sekuensing Sanger dan metode next generation sequencing44	
3.1 Lokasi pengambilan sampel..... 59	
4.1 Habitat yang teridentifikasi di Desa Pulau Panggung, Kabupaten Muara Enim, Provinsi Sumatera Selatan. 82	
4.2 Habitat yang teridentifikasi di Desa Muara Emil, Kabupaten Muara Enim, Provinsi Sumatera Selatan. 82	
4.3 Habitat yang teridentifikasi di Desa Gayau-Durian, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung..... 82	
4.4 Keragaman spesies <i>Anopheles</i> yang ditangkap di Desa Pulau Panggung Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan. 85	
4.5 Keragaman spesies <i>Anopheles</i> yang ditangkap di Desa Pulau Muara Emil Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan. 85	
4.6 Keragaman spesies <i>Anopheles</i> yang ditangkap di Desa Gayau dan Durian Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung. 85	
4.7 Hasil kolonisasi 200 larva nyamuk <i>Anopheles</i> vagus di Desa Gayau-Durian.88	
4.8 Hasil kolonisasi 400 larva nyamuk <i>Anopheles</i> vagus di Desa Muara Emil. .. 88	

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus hidup <i>Plasmodium</i> . ⁵⁵	9
2.2 <i>Anopheles maculatus</i> . ²³	14
2.3 Siklus hidup nyamuk <i>Anopheles spp.</i> ⁶⁰	15
2.4 Distribusi vektor <i>Anopheles spp</i> di Indonesia. ⁶⁷	17
2.5 Distribusi spesies <i>Anopheles spp</i> di Sumatera Selatan. ³²	18
2.6 Karakteristik umum sayap nyamuk <i>An. vagus</i> . ⁴⁴	28
2.7 Perbedaan <i>An. vagus</i> (A) dan <i>An. limosus</i> (B) pad <i>proboscis</i> , palpi, dan prehumeral pada penelitian di Jawa Timur. ⁴⁵	30
2.8 Bentuk <i>karyotyping metaphase An. vagus</i> Form A dan Form B. ³⁸	38
2.9 Diagram skema <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS). (a) Lokasi Urutan Spacer Transkripsi Internal 1 & 2 dan (b) Posisi primer untuk amplifikasi PCR. ¹⁰⁶	41
2.10 Mitokondrial genom <i>An. stephensi</i> dan <i>An. dirus</i> . ¹¹¹	42
2.11 Struktur pohon evolusi.	46
2.12 Skema pemilihan metode prediksi filogenetik ¹¹⁴	47
2.13 Peta Kabupaten Muara Enim. ¹²³	54
2.14 Peta administrasi Kabupaten Pesawaran. ¹²⁶	57
4.1 Peta geografi lokasi sampel penelitian.	79
4.2 Keragaman spesies nyamuk di Desa Pulau Panggung, Muara Emil, dan Gayau-Durian.	81
4.3 Komposisi spesies <i>Anopheles</i> berdasarkan area penangkapan. Area yang beririsan menunjukkan nyamuk yang ditemukan pada ketiga daerah penangkapan.	84
4.4 Nyamuk <i>An. vagus</i> dari Desa Muara Emil, Kabupaten Muara Enim, Provinsi Sumatera Selatan.	86
4.5 Bagian kepala dan sayap nyamuk <i>An. vagus</i> Sumatera Selatan dan Jawa Timur. Anak panah biru menunjukkan palpus dengan pita pucat dengan panjang kurang lebih 3 kali panjang pita gelap dibawahnya. Anak panah merah menunjukkan sayap memiliki 4 atau lebih pita pucat pada bagian costa.	87

4.6 Hasil elektroforesis amplicon PCR sampel dengan primer nDNA ITS2 (atas) dan mtDNA COI (bawah). Sampel nomer 8 dan 14 setelah di <i>blast</i> bukan <i>An. vagus</i> namun <i>An. subpictus</i> , sehingga di <i>exclude</i> kan dalam analisis <i>Sequence Alignment</i>	90
4.7 Hasil elektroforesis PCR <i>band target</i> 750an bp nyamuk sampel Sumatera Selatan, Lampung dan Jawa Timur dengan primer ND6 (F4-R3).	91
4.8 Hasil Penyejajaran nyamuk sampel <i>An. vagus</i> dengan nDNA ITS2. Persentase similaritas 99-100%.	97
4.9 Hasil persentase kemiripan sampel nyamuk <i>An. vagus</i> dengan sekuens referensi nyamuk <i>An. vagus</i> pada data di <i>genebank</i>	98
4.10 Hasil Penyejajaran nyamuk sampel <i>An. vagus</i> dengan COI . Persentase identitas homolog 98-100%	104
4.11 Tingkat kesamaan susunan sekuens <i>An. vagus</i> sampel dengan mt DNA COI dan sekuens referensi yang berasal dari <i>genebank</i>	105
4.12 Hasil Penyejajaran nyamuk sampel <i>An. vagus</i> dengan ND6. Persentase similaritas 100%.	107
4.13 Pohon filogenetik sampel nDNA ITS2 nyamuk <i>An. vagus</i>	109
4.14 Pohon filogenetik sampel mtDNA COI nyamuk <i>An. vagus</i>	110
4.15 Pohon Filogenetik Sampel mtND6 Nyamuk <i>An. vagus</i>	111

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Sertifikat Etik Layak Penelitian	140
2. Surat Izin Penelitian dari Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung	141
3. Surat Rekomendasi Penelitian dari Badan Kesatuan Bangsa dan Politik Pemerintah Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung	142
4. Surat Izin Penelitian dari Dinas Kesehatan Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan	143
5. Hasil Analisis dengan <i>NetPrimer</i>	144
6. Hasil Analisis Sekuensing	149
7. Hasil Elektropherogram Sekuens nDNA ITS 2 dan mtDNA COI	153
8. Persentase Similaritas <i>Outgrup</i> , Referensi dan Sampel pada Sekuens nDNA ITS2	156
9. Persentase Similaritas <i>Outgrup</i> , Referensi dan Sampel pada Sekuens mtDNA COI	157
10. <i>Distance Outgrup</i> , Referensi dan Sampel pada Sekuens nDNA ITS2	158
11. <i>Distance Outgrup</i> , Referensi dan Sampel pada Sekuens mtDNA COI	159

DAFTAR SINGKATAN

°C	: Derajat Celcius
<i>Ae.</i>	: <i>Aedes</i>
<i>An.</i>	: <i>Anopheles</i>
API	: <i>Annual parasite incidence</i>
<i>Ar.</i>	: <i>Armigeres</i>
ASPCR	: <i>allelespecific PCR</i>
b/v	: berat per volume
COI	: <i>Cytochrome Oxidase I</i>
COII	: <i>Cytochrome Oxidase II</i>
<i>Cx.</i>	: <i>Culex</i>
DHP	: Dihydroartemisinin dan piperakuin
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Dpl	: di atas permukaan laut
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDC	: Fixed Dose Combination
G	: gram
GPS	: <i>Global Positioning System</i>
HAD	: <i>Heteroduplex Analysis</i>
HLC	: <i>Human landing collection</i>
ITS	: <i>Interal Transcribed Spacer</i>
JE	: <i>Japanese Encephalitis</i>
Kemenkes	: Kementerian Kesehatan
KLBB	: Kejadian Luar Biasa
Km ²	: Kilometer persegi
M	: Meter
<i>Ma.</i>	: <i>Mansonia</i>
Mm	: Milimeter
msa	: <i>multiple sequence alignment</i>
mtDNA	: <i>mitochondrial DNA</i>

NADH	: <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
mtND6	: <i>mitochondrial NADH dehydrogenase sub- unit six genes</i>
nDNA	: <i>nuclear DNA</i>
OKU	: <i>Ogan Komerling Ulu</i>
<i>P.</i>	: <i>Plasmodium</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-RFLP	: <i>Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polimorfism</i>
RDT	: <i>Rapid Diagnostic Test</i>
rDNA-ITS	: <i>Ribosom DNA Internal Transcribed Spacer</i>
RD	: <i>Resting dalam</i>
RL	: <i>Resting luar</i>
RC	: <i>Resting Collection</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
SSCP	: <i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>
SSU	: <i>Small-subunit</i>
UOD	: <i>Umpan Orang Dalam</i>
UOL	: <i>Umpan Orang Luar</i>
UPGMA	: <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means</i>
WIB	: <i>Waktu Indonesia bagian Barat</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Wilayah Asia Tenggara secara global masih menjadi wilayah tertinggi kedua kasus malaria setelah Afrika.¹ Diperkirakan delapan juta kasus dan 11.600 kematian akibat malaria di kawasan ini. Indonesia sebagai negara di kawasan Asia Tenggara masih berstatus endemis malaria. Ada sebanyak 214 kabupaten/kota di Indonesia yang masih endemis malaria tersebar dari Sumatera hingga Papua.² Pada tahun 2023, dua kabupaten masih endemik di Provinsi Sumatera Selatan, yaitu Kabupaten Lahat dan Muara Enim.³ Dua kabupaten yang masih endemis malaria di Provinsi Lampung yaitu Kabupaten Pesawaran, dan Kota Bandar Lampung.⁴

Nyamuk *Anopheles* berperan sebagai vektor malaria.⁵ Tercatat sebanyak 80 spesies *Anopheles* di Indonesia, dengan 26 spesies di antaranya merupakan vektor malaria.⁶ Spesies nyamuk *Anopheles* dibedakan satu dengan lainnya dengan mengidentifikasi morfologi sebagai metode standar untuk mengidentifikasi spesies nyamuk berdasarkan karakter eksternal mereka. Spesies nyamuk yang berbeda menunjukkan ciri morfologi yang dapat dibedakan pula sesuai kunci taksonomi.⁷ Namun ada kelompok nyamuk *Anopheles* yang memiliki morfologi yang mirip atau hampir tidak dapat dibedakan namun terisolasi secara reproduktif dalam takson dikenal sebagai spesies samar atau kriptik atau spesies isomorfik.⁸

Dalam satu kelompok spesies *Anopheles* yang sama terkadang menunjukkan perbedaan yang jelas pada pemilihan habitat peristirahatan, preferensi untuk memakan inang, laju perkembangan resistensi terhadap insektisida, dan kerentanan terhadap mendapatkan infeksi. Semua perbedaan ini dapat menunjukkan keberadaan spesies kriptik dalam spesies yang telah ada (spesies dalam unit nomenklatur taksonomi). Perbedaan-perbedaan perilaku dapat ditemukan bersamaan dengan variasi genetik pada pemeriksaan filogenetik. Namun, hal ini tidak dapat memberikan status “spesies” pada populasi sehingga bukan dianggap sebagai spesies baru melainkan bagian dari spesies yang telah ada

dalam populasi dan sering diistilahkan sebagai kompleks spesies (*species complexes*).⁹ Terdapat dua belas spesies nyamuk *Anopheles spp* kawasan Asia Tenggara terdata sebagai *Anopheles species complexes*.⁹ *An. sondaicus*, *An. maculatus*, *An. barbirostris*, dan *An. punctulatus* merupakan *Anopheles species complexes* yang telah terbukti di Indonesia memiliki beberapa variasi genetik.¹⁰⁻¹²

Pada pemeriksaan keragaman dan variasi genetik, gen *nuclear Internal Transcribed Spacer* (ITS), *mitochondrial Cytochrome Oxidase* (COI), *Cytochrome b* (Cyt b), adalah alat diagnostik yang cukup handal dalam mempelajari keragaman tersebut dan mencari hubungan intraspesifik kekerabatan antarnyamuk.^{10,11,13-17} Nukleolar DNA (nDNA) ITS2 memiliki *region* yang sangat terkonservasi, mudah dalam amplifikasi karena ukuran marka molekuler ini relatif tidak terlalu panjang dengan kisaran 400–700 pb, serta kemampuan sekuen tersebut untuk membedakan antar spesies dan taksa di atasnya.¹⁸ Namun marka ini kurang mampu membedakan variasi intraspesies. Sebaliknya marka DNA mitokondrial (mtDNA) COI memiliki laju evolusinya yang lebih cepat dibandingkan nDNA ITS2 membuat marka ini dapat mengidentifikasi spesies nyamuk yang berkerabat sangat dekat seperti pada spesies kriptik dan *siblings species*.^{19,20} Namun, gen marka mtDNA COI mungkin tidak dapat diterapkan secara universal untuk mengidentifikasi semua spesies nyamuk tertentu dari *Anopheles* dan *Culex*.^{7,19} Marka mtDNA ND6 merupakan bagian unit gen pada mitokondrial merupakan pilihan marka yang baru yang dipakai mulai tahun 2000an, dengan wilayah gen yang lebih bervariasi dari mtCOI dan mampu membedakan *Anopheles species complex* pada *Leucosphyrus* Group, sebagian *Nyssorhynchus* Group dan *Hyrchanus* Group.²¹⁻²³

Anopheles vagus subgenus *Cellia* menjadi vektor penyakit malaria, filariasis, dan *Japanese Encephalitis* (JE) di Indonesia.^{6,24} Meski hingga saat ini, *An. vagus* bukanlah vektor utama malaria, di beberapa negara di Asia, nyamuk ini telah dipastikan sebagai vektor sekunder malaria.²⁵⁻²⁹ Populasi nyamuk ini melimpah di daratan Asia dan kawasan Asia Tenggara, terutama di India, Thailand, Bangladesh, China dan Indonesia.³⁰⁻³² Nyamuk *An. vagus* telah terkonfirmasi menjadi vektor dengan ditemukannya sporozoit *Plasmodium spp*

yang berasal dari wilayah Kabupaten Lahat, Muara Enim, dan Ogan Komering Ulu (OKU) Selatan.^{33,34} Parasit *Plasmodium spp* juga ditemukan pada nyamuk ini bersama nyamuk lainnya seperti *An. barbirostris*, *An. subpictus*, *An. sondaicus* yang berasal dari Kabupaten Pesawaran yang diperiksa dengan metode *nested Polymerase Chain Reaction* (Nested PCR).³⁵

Dahulu, *An. vagus* memiliki subspecies yang dipisahkan melalui perbedaan morfologi, yaitu *Anopheles vagus limosus*, awalnya subspecies ini dilaporkan berasal dari pulau Filipina.³⁰ *Anopheles vagus limosus* kemudian dipromosikan sebagai spesies baru berdasarkan perbedaan morfologi oleh Ramalingan et al (1974), yang mengumpulkan dua subspecies tersebut pada spesiasi simpatrik di Sabah, Malaysia.³⁶ Dalam klasifikasi kladistik *Anopheles* saat ini, *An vagus* dan *An limosus* diperlakukan sebagai spesies yang terpisah berdasarkan morfologi dan morphometric nya pada nomenklatur Harbach.^{37,38}

Anopheles vagus telah dicurigai sebagai kompleks spesies. Penelitian *An. vagus* secara morfologi, kromosom, ekologi, dan molekuler telah dilakukan pada beberapa kawasan Asia, Sulawesi dan Jawa Indonesia serta Timor timur dengan beragam metode dan hasil yang berbeda baik secara morfologi, karyotyping, maupun molekuler.^{39,40,49-51,41-48} Hal ini terangkum dalam penelitian literatur review sebagai studi pendahuluan dengan menganalisis semua hasil penelitian yang terkait kecurigaan *An. vagus* sebagai *species complex*. Literatur review yang telah dipublikasi mendapatkan hasil bahwa sekuens *An. vagus* berdasarkan marka ITS2 menunjukkan kekerabatan sebagai spesies monofiletik dan bersama *An. limosus* bersifat *conspesific species* (sejenis) meskipun karakteristik morfologinya berbeda.⁵²

Atas dasar hasil penelitian literatur review tersebut, menjadi dasar penulis dalam melakukan penelitian terhadap nyamuk *An. vagus* kawasan Indonesia secara umum dan kawasan Sumatera Bagian Selatan yang masih berstatus endemis malaria secara khusus dengan menganalisis dan memeriksa kembali apakah *An. vagus* sebagai satu spesies monofiletik dan apakah *An. vagus* dan *An. limosus* sebagai *conspesific species* dengan menggunakan marka nITS2, mtCOI, dan menggunakan marka baru mtDNA ND6. Penggunaan ketiga marka molekuler

ini dalam penelitian dapat saling menutupi kekurangan dalam analisis pada masing-masing sekuens genom, dan juga untuk saling mengkonfirmasi variasi genetik yang ada untuk membuat suatu hubungan kekerabatan dalam pohon filogenetik. Selain pemeriksaan molekuler, pemeriksaan *metaphase karyotype* dan uji coba perkawinan silang antara *An. vagus* dan *An. limosus* dapat menjadi bukti tambahan untuk memastikan statusnya sebagai *conspesific species* atau *species complex*.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang dipaparkan tersebut, beberapa pertanyaan penelitian yang dirangkum sebagai berikut:

- 1.2.1. Bagaimana keragaman dan kelimpahan nyamuk spesies *Anopheles spp* yang tertangkap di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung?
- 1.2.2. Apakah ada perbedaan morfologi diantara nyamuk spesies *An. vagus* dan antara spesies *An. vagus* dengan *An. limosus* yang berasal dari Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung?
- 1.2.3. Bagaimana bentuk karyotipik metafase nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus* dan adakah variasi bentuk bentuk karyotipik metafase nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus* yang berasal dari Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung?
- 1.2.4. Apakah pada *crossmating experiment* pada *An. vagus* dan *An. limosus* dan menghasilkan keturunan yang viable?
- 1.2.5. Bagaimana sekuens genetik dengan marka marka *nDNA* ITS2 serta marka *mtDNA* COI dan *mtDNA* ND6 pada *An. vagus* dan *An. limosus* yang berasal dari Indonesia.
- 1.2.6. Adakah hubungan kekerabatan (filogenetik) pada spesies *An. vagus* dan *An. limosus* yang berasal dari Indonesia?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1.3.1.1 Mengetahui keragaman dan kelimpahan nyamuk spesies *Anopheles spp* di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan, dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Menganalisis bentuk morfologi di antara nyamuk spesies *An. vagus* dan *An. limosus* yang berasal dari Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung.

1.3.2.2 Menganalisis bentuk kariotipik metafase nyamuk *An. vagus* yang berasal dari Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung.

1.3.2.3 Menganalisis hasil *crossmating experiment* diantara nyamuk *An. vagus* dan *An. limosus*.

1.3.2.4 Menganalisis sekuens genetik dengan marka nDNA ITS2, mtDNA COI dan mtDNA ND6 spesies *An. vagus* dan *An. limosus* yang berasal dari Indonesia.

1.3.2.5 Menganalisis hubungan kekerabatan (filogenetik) nyamuk *An. vagus* dan nyamuk *An. limosus* yang berasal dari Indonesia.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Memperkuat teori sebelumnya, bahwa nyamuk *An. vagus* dari wilayah Indonesia sebagai spesies monofiletik dan *An. vagus* dan *An. limosus* sebagai *conspesific species*.

1.4.2 Menjadi rujukan bagi penelitian berikutnya penggunaan desain primer mtDNA ND6 pada penelitian ini, terhadap spesies *Anopheles* lainnya dalam *Pyrethoporus series*.

1.4.3 Memberikan informasi kepada dinas terkait dalam upaya eliminasi sekaligus mempertahankan status eliminasi malaria khususnya di Sumatera Selatan.

1.5 Kebaruan Penelitian

- 1.5.1 Keragaman nyamuk di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung.
- 1.5.2 Desain primer mtND6 sebagai barcoding DNA spesies *An. vagus*.
- 1.5.3 Hubungan kekerabatan (*phylogenetic tree analysis*) pada *An. vagus* wilayah Indonesia yang diidentifikasi dengan marka nDNA ITS2, MtDNA COI, dan MtDNA ND6.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. World Malaria Report: 20 years of global progress and challenges [Internet]. World Health Organization. 2020. 300 p. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
2. Kementerian Kesehatan RI. Situasi Terkini Perkembangan Program Pengendalian Malaria di Indonesia Tahun 2018 [Internet]. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2018. Available from: <https://drive.google.com/file/d/1RTA5DSsvY89dCy6Zz48C--XuwxjCaKAb/view>
3. Dinkes Propinsi Sumsel. South Sumatera Annual Malaria Report 2023 [Internet]. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan. 2023. 1–23 p. Available from: <https://dinkes.sumselgo.id/2022/09/profil-tahun-2022/>
4. Dinkes Propinsi Lampung. Laporan Evaluasi Program Malaria Provinsi Lampung Tahun 2023. 2023.
5. CDC. Anopheles Mosquitoes [Internet]. 2015. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html#tabs-1-5>
6. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit, Penyakit V dan R. Rikhus Vektora. 2017. p: 1–188.
7. Chan A, Chiang LP, Hapuarachchi HC, Tan CH, Pang SC, Lee R, et al. DNA barcoding: Complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–12.
8. Choochote W, Saeung A. Systematic Techniques for the Recognition of Anopheles Species Complexes. In: Manguin ASES, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rijeka: IntechOpen; 2013. p. Ch. 2.
9. Morgan K, Somboon P, Walton C. Understanding Anopheles Diversity in Southeast Asia and Its Applications for Malaria Control. In: Manguin S, editor. *Rijeka: IntechOpen; 2013. p. Ch. 11*. Available from: <https://doi.org/10.5772/55709>
10. Syafruddin D, Lestari YE, Permana DH, Asih PBS, Laurent BS, Zubaidah S, et al. Anopheles sundaicus complex and the presence of anopheles epiroticus in Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(7):1–16.
11. Garjito TA, Widiastuti U, Mujiyono M, Prihatin MT, Widiarti W, Setyaningsih R, et al. Genetic homogeneity of Anopheles maculatus in

- Indonesia and origin of a novel species present in Central Java. *Parasites and Vectors*. 2019;12(1):1–11.
12. St. Laurent B, Supratman S, Asih PBS, Bretz D, Mueller J, Miller HC, et al. Behaviour and molecular identification of *Anopheles malaria* vectors in Jayapura district, Papua province, Indonesia. *Malar J*. 2016;15(1):1–9.
 13. Bunmee K, Thaenkham U, Saralamba N, Ponlawat A, Zhong D, Cui L, et al. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles minimus* in Thailand based on mitochondrial DNA markers. *Parasites and Vectors*. 2021;14(1):496.
 14. Li S, Jiang F, Lu H, Kang X, Wang Y, Zou Z, et al. Mosquito Diversity and Population Genetic Structure of Six Mosquito Species From Hainan Island. *Front Genet*. 2020;11(October):1–10.
 15. Escobar D, Ascencio K, Ortiz A, Palma A, Fontecha G. Distribution and phylogenetic diversity of *Anopheles* species in malaria endemic areas of Honduras in an elimination setting. *Parasites and Vectors*. 2020;13(1):1–12.
 16. Zhong D, Hemming-Schroeder E, Wang X, Kibret S, Zhou G, Atieli H, et al. Extensive new *Anopheles* cryptic species involved in human malaria transmission in western Kenya. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13.
 17. Gajapathy K, Jude PJ, Goodacre SL, Peiris LBS, Ramasamy R, Surendran SN. Molecular characterization of the malaria vector *Anopheles barbirostris* van der Wulp in Sri Lanka. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–5.
 18. Weeraratne TC, Surendran SN, Walton C, Karunaratne SHPPPP. Genetic diversity and population structure of malaria vector mosquitoes *Anopheles subpictus*, *Anopheles peditaeniatus*, and *Anopheles vagus* in five districts of Sri Lanka. *Malar J*. 2018;17(1):1–8.
 19. Beebe NW. DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. Vol. 145, *Parasitology*. 2018. p. 622–33.
 20. Singh D, Vashist D. DNA barcoding as a tool supporting species identification and molecular phylogeny for Indian *Anopheles* (Diptera:Culicidae:Anophelinae). *J Entomol Res*. 2020;44(3):409–16.
 21. Takano KT, Nguyen NTH, Nguyen BTH, Sunahara T, Yasunami M, Nguyen MD, et al. Partial mitochondrial DNA sequences suggest the existence of a cryptic species within the *Leucosphyrus* group of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae), forest malaria vectors, in northern

- Vietnam. *Parasit Vectors*. 2010 Apr;3:41.
22. Bourke BP, Foster PG, Bergo ES, Calado DC, Sallum MAM. Phylogenetic relationships among species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Acta Trop* [Internet]. 2010;114(2):88–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.009>
 23. Dong H, Yuan H, Yang X, Shan W, Zhou Q, Tao F, et al. Phylogenetic Analysis of Some Species of the *Anopheles hyrcanus* Group (Diptera: Culicidae) in China Based on Complete Mitochondrial Genomes. *Genes* (Basel). 2023;14(7).
 24. Garjito TA, Widiarti, Anggraeni YM, Alfiah S, Tunggul Satoto TB, Farchanny A, et al. Japanese encephalitis in Indonesia: An update on epidemiology and transmission ecology. *Acta Trop* [Internet]. 2018;187:240–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.017>
 25. Astuti EP, Ipa M, Prasetyowati H, Fuadzy H, Dhewantara PW. Kapasitas Vektor dan Laju Inokulasi Entomologis *Anopheles vagus* dari Wilayah Endemis Malaria di Provinsi Banten. *Vektora J Vektor dan Reserv Penyakit*. 2016;8(1):23–30.
 26. Pinontoan OR, Supadmanaba IGP, Manuaba IBAP, Sukrama IDM, Manuaba IBAP. Local Diversity and Biting Pattern of *Anopheles* Species in Southern Minahasa. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2017/08/06. 2017;1–6.
 27. Al-Amin HM, Rodriguez I, Phru CS, Khan WA, Haque R, Nahlen BL, et al. Composition of *Anopheles* species and bionomic characteristics over the peak malaria transmission season in Bandarban, Bangladesh. *Malar J* [Internet]. 2023;22(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04614-2>
 28. Al-Amin HM, Elahi R, Mohon AN, Kafi MAH, Chakma S, Lord JS, et al. Role of underappreciated vectors in malaria transmission in an endemic region of Bangladesh-India border. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–9. Available from: ???
 29. Febriyantiningih DE, Senjarini K, Oktarianti R. Identification of Immunogenic Salivary Proteins of *Anopheles vagus* based on Mass Spectrometry Analysis. *J Ilmu Dasar*. 2017;18(2):73.
 30. Rueda LM, Pecor JE, Harrison BA. Updated distribution records for *Anopheles vagus* (Diptera: Culicidae) in the Republic of Philippines,

and considerations regarding its secondary vector roles in Southeast Asia. *Trop Biomed.* 2011 Apr;28(1):181–7.

31. Dhiman S, Yadav K, Rabha B, Goswami D, Hazarika S, Tyagi V. Evaluation of insecticides susceptibility and malaria vector potential of *Anopheles annularis* s.l. and *Anopheles vagus* in Assam, India. *PLoS One.* 2016;11(3):1–13.
32. Alam MZ, Niaz Arifin SM, Al-Amin HM, Alam MS, Rahman MS. A spatial agent-based model of *Anopheles vagus* for malaria epidemiology: Examining the impact of vector control interventions. *Malar J.* 2017;16(1):1–20.
33. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan. Laporan Pelaksanaan Program Pencegahan dan Pengendalian Malaria Provinsi Sumatera Selatan. Palembang: Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan; 2020.
34. Budiyanto A, Ambarita LP, Salim M. Konfirmasi *Anopheles sinensis* dan *Anopheles vagus* sebagai Vektor Malaria di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan. *Aspirator - J Vector-borne Dis Stud.* 2017;9(2):51–60.
35. Ritawati, Supranelfi Y, Spirakel. Berbagai Aspek Tentang Malaria Di Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung. *Spirakel.* 2018;10(1):41–53.
36. Ramalingan S. Some new records of *Anopheles* from Sabah, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1974;5(1):147 – 148.
37. Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory [Internet]. 2021. Available from: www.mosquito-taxonomic-inventory.info
38. Harbach RE. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes*. Rijeka: IntechOpen; 2013. p. Ch. 1.
39. Baimai V, Kijchalao U, Rattarithikul R. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia. VI. The *Pyretophorus* and the *Neomyzomyia* series, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc.* 1996;12(4):669–75.
40. Choochote W, Jitpakdi A, Sukontason K, Chaithong U, Wongkamchai S, Pitasawat B, et al. Intraspecific hybridization of two karyotypic forms of *Anopheles vagus* (Diptera: Culicidae) and the related egg surface topography. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002;33 Suppl 3:29–35.

41. Cooper RD, Edstein MD, Frances SP, Beebe NW. Malaria vectors of Timor-Leste. *Malar J.* 2010;9(1):1–11.
42. Zarowiecki M, Walton C, Torres E, Mcalister E, Htun PT, Sumrandee C, et al. Pleistocene genetic connectivity in a widespread, open-habitat-adapted mosquito in the Indo-Oriental region. *J Biogeogr.* 2011;38(7):1422–32.
43. Zomuanpui R, Ringngheti L, Brindha S, Gurusubramanian G, Senthil Kumar N. ITS2 characterization and Anopheles species identification of the subgenus Cellia. *Acta Trop.* 2013 Mar;125(3):309–19.
44. Alfiah S, Mujiyono. Variasi Morfologi Anopheles Vagus Donitz dari habitat Air Tawar dan Air Payau. *Vektora J Vektor dan Reserv Penyakit.* 2014;6(September):61–8.
45. Paul S, Chattopadhyay A, Banerjee PK. Studies on seasonal abundance & molecular characterization of Anopheles subpictus and Anopheles vagus based on ITS2 sequence variability. *Int J Mosq Res.* 2015;2(3):131–5.
46. Paul S, Banerjee PK. Cytological and Molecular Studies Based on Ovarian Nurse Cell's Polytene Chromosome and ITS-2 Sequence of Anopheles vagus in West Bengal. *Int J Res Stud Zool.* 2016;2(4):68–73.
47. Wahyuni I, Senjarini K, Oktarianti R, Wathon S, Nur Uswatul Hasanah L. Identifikasi Morfologi Spesies Sibling Anopheles vagus vagus dan Anopheles vagus limosus Asal Desa Bangsring, Banyuwangi. *Biosf J Biol dan Pendidik Biol.* 2018;8(February 2020):27–31.
48. Senjarini K, Hasanah LNU, Septianasari MA, Abdullah MK, Oktarianti R, Wathon S. Karakterisasi Berbasis Marka Molekuler ITS2 Terhadap Sub-Spesies Kompleks Anopheles vagus vagus Dan Anopheles vagus limosus. *J Bioteknologi Biosains Indones.* 2021 Dec;8(2):174–184.
49. Senjarini K, Abdullah MK, Azizah N, Septianasari MA, Tosin A, Oktarianti R, et al. Redesigning Primer of ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) for Specific Molecular Characterization of Malaria Vectors Anopheles Species. *Med Arch.* 2021;75(6):418–23.
50. Hasanah LNU, Masruroh D, Wahyuni I, Oktarianti R, Wathon S, Labes A, et al. Internal transcribed spacer 2 (ITS2) based molecular identification of malaria vectors from Bangsring Banyuwangi-Indonesia. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol.* 2022;30(3):57–68.

51. Zhang C, Yang R, Wu L, Luo C, Yang Y, Deng Y, et al. Survey of malaria vectors on the Cambodia, Thailand and China-Laos Borders. *Malar J* [Internet]. 2022;21(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04418-w>
52. Dalilah D, Syafruddin D, Saleh I, Ghiffari A, Vernadesly L, Syahrani L, et al. A systematic review: is *Anopheles vagus* a species complex? *Malar J* [Internet]. 2024;23(1):88. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-024-04888-0>
53. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(1):1–11.
54. Lempang MEP, Permana DH, Asih PBS, Wangsamuda S, Dewayanti FK, Rozi IE, et al. Diversity of *Anopheles* species and zoonotic malaria vector of the Buton Utara Wildlife Sanctuary, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Malar J* [Internet]. 2023;22(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04647-7>
55. Sugiarto SR, Baird JK, Singh B, Elyazar I, Davis TME. The history and current epidemiology of malaria in Kalimantan, Indonesia. *Malar J* [Internet]. 2022;21(1):327. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04366-5>
56. Kementerian Kesehatan RI. *Buku Saku Penatalaksanaan Kasus Malaria*. 2019. 1–38 p.
57. Lee AH, Symington LS, Fidock DA. DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):469–86.
58. Tumwebaze P, Tukwasibwe S, Taylor A, Conrad M, Ruhamyankaka E, Asua V, et al. Changing antimalarial drug resistance patterns identified by surveillance at three sites in Uganda. *J Infect Dis*. 2017;215(4):631–5.
59. Meibalan E, Marti M. *Biology of Malaria Transmission*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;1–15.
60. Hahn WO, Pottinger PS. Malaria in the Traveller: How to Manage Before Departure and Evaluate Upon Return. *Med Clin North Am*. 2016;100(2):289–302.
61. Mukry SN, Saud M, Sufaida G, Shaikh K, Naz A, Shamsi TS. Laboratory diagnosis of malaria: Comparison of manual and automated diagnostic tests. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2017;2017.

62. Calderaro A, Piccolo G, Chezzi C. The Laboratory Diagnosis of Malaria: A Focus on the Diagnostic Assays in Non-Endemic Areas. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan;25(2).
63. Ahmed R, Devnath K, Bhowmik D, Sharma I. High-sensitivity detection of human malaria parasites by the use of rapid diagnostic tests and nested polymerase chain reaction in burdened communities of North East India. *Indian J Med Microbiol.* 2018;36(4):541–6.
64. WHO. Global technical strategy for malaria 2016-2030, 2021 update. Meyrin: World Health Organization; 2021.
65. O'Connor, Soepanto A. Kunci bergambar nyamuk Anopheles di Indonesia. 1999. 1–20 p.
66. Okuneye K, Eikenberry SE, Gumel AB. Weather-driven malaria transmission model with gonotrophic and sporogonic cycles. *J Biol Dyn.* 2019;13(sup1):288–324.
67. Yahya Y, Haryanto D, Pahlevi RI, Budiyanto A. Keanekaragaman Jenis Nyamuk Anopheles di Sembilan Kabupaten (Tahap Pre-Eliminasi Malaria) Di Provinsi Sumatera Selatan. *J Vektor dan Reserv Penyakit.* 2020 Jul;12(1):41–52.
68. Lestari S, Adrial A, Rasyid R. Identifikasi Nyamuk Anopheles Sebagai Vektor Malaria dari Survei Larva di Kenagarian Sungai Pinang Kecamatan Koto XI Tarusan Kabupaten Pesisir Selatan. *J Kesehat Andalas.* 2016;5(3):656–60.
69. Mahdalena V, Ni'mah T. Ekologi Nyamuk Anopheles spp. Di Kecamatan Lengkiti, Ogan Komering Ulu, Sumatera Selatan Tahun 2004-2015. *Spirakel.* 2017;8(2):27–36.
70. Mahdalena V, Wurisastuti T. Gambaran Distribusi Spesies Anopheles Dan Perannya Sebagai Vektor Malaria Di Provinsi Nusa Tenggara Timur, Papua Dan Papua Barat. *Spirakel.* 2021;12(1):46–59.
71. Santos CS, Pie MR, da Rocha TC, Navarro-Silva MA. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *PLoS One.* 2019;14(2):1–18.
72. Jeyaprakasam NK, Low VL, Liew JWK, Pramasivan S, Wan-Sulaiman WY, Saeung A, et al. Blood meal analysis of Anopheles vectors of simian malaria based on laboratory and field studies. *Sci Rep [Internet].* 2022;12(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04106-w>

73. Elyazar IRF, Sinka ME, Gething PW, Tarmidzi SN, Surya A, Kusriastuti R, et al. The distribution and bionomics of *Anopheles malaria* vector mosquitoes in Indonesia. *Adv Parasitol.* 2013;83:173–266.
74. Kesumawati Hadi U, Sigit SH, Sukowati S. Distribusi Spasial Dan Bioekologi *Anopheles* Spp. Di Lampung Selatan Dan Pesawaran, Provinsi Lampung. *J Ekol Kesehat [Internet].* 2010;9(3):1290–301. Available from: <https://www.neliti.com/id/publications/83371/>
75. Mallet J. Species, Concepts of. In: *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition.* 2013. p. 679–91.
76. Singh BN. Allopatric and sympatric modes of speciation: examples from *Drosophila*. *Curr Sci.* 2021;121(1):56–60.
77. Shapiro BJ, Leducq JB, Mallet J. What Is Speciation? *PLoS Genet.* 2016;12(3):1–14.
78. Richards EJ, Servedio MR, Martin CH. Searching for Sympatric Speciation in the Genomic Era. *BioEssays.* 2019;41(7).
79. Wilkins JS. Phylogenetic Species Concepts. In: *Species.* 2019. p. 241–54.
80. World Health Organization. *Anopheline Species Complexes in South and South-East Asia.* New Delhi: World Health Organization; 2007.
81. Sukowati S, Andris H, Sondakh J S. Penelitian Species Sibling Nyamuk *Anopheles barbirostris* vander wulp di Indonesia. *J Ekol Kesehat.* 2004;4:172–80.
82. Hoy MA. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications: Second Edition.* Science direct. 2013. 1–544 p.
83. St Laurent B, Sukowati S, Burton TA, Bretz D, Zio M, Firman S, et al. Comparative evaluation of anopheline sampling methods in three localities in Indonesia. *Malar J.* 2018;17(1):13.
84. Zhang C, Sorchampa S, Zhou H, Jiang J, Yang R, Zhang Y. Survey of asymptomatic malaria and mosquito vectors in Muang Khua District of Phongsaly Province, China–Laos Border. *Int J Infect Dis.* 2020 Jul 1;96:141–7.
85. Sumruayphol S, Chaiphongpachara T, Samung Y, Ruangsittichai J, Cui L, Zhong D, et al. Seasonal dynamics and molecular differentiation of

- three natural *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) of the *Maculatus* group (*Neocellia* series) in malaria hotspot villages of Thailand. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2020;13(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04452-0>
86. Setiyaningsih R, Prihasto S, Ayuningrum FD, Prasetyo AS, Prihatin MT, Negari S, et al. Distribution and behavior of *Anopheles maculatus* and its potential as a Malaria vector in Indonesia. *Epidemiol Soc Heal Rev*. 2023;5(1):41–50.
 87. Ali RSM, Wahid I, Saeung A, Wannasan A, Harbach RE, Somboon P. Genetic and morphological evidence for a new species of the *Maculatus* Group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) in Java, Indonesia. *Parasites and Vectors*. 2019;12(1):1–12.
 88. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. Erratum: The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis (*Parasit Vectors* (2010) 3 (72)). *Parasites and Vectors*. 2011;4(1).
 89. Syahrani L, Permana DH, Syafruddin D, Zubaidah S, Asih PBS, Rozi IE, et al. An inventory of human night-biting mosquitoes and their bionomics in Sumba, Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(3):1–16.
 90. Mbewe RB, Keven JB, Mzilahowa T, Mathanga D, Wilson M, Cohee L, et al. Blood-feeding patterns of *Anopheles* vectors of human malaria in Malawi: implications for malaria transmission and effectiveness of LLIN interventions. *Malar J* [Internet]. 2022;21(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04089-7>
 91. Pumpaibool T, Chakim I. The diversity of *Anopheles* blood feeding patterns suggests different malaria protection strategies in different localities. *F1000Research*. 2020;8.
 92. Sukowati S, Baimai V. A standard cytogenetic map for *Anopheles sunaicus* (Diptera: Culicidae) and evidence for chromosomal differentiation in populations from Thailand and Indonesia. *Genome*. 1996 Feb;39(1):165–73.
 93. Sukowati S, Baimai V, Harun S, Dasuki Y, Andris H, Efriwati M. Isozyme evidence for three sibling species in the *Anophelos sunaicus* complex from Indonesia. *Med Vet Entomol*. 1999 Oct;13(4):408–14.
 94. Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull*

Entomol Res. 2004 Dec;94(6):537–53.

95. Qin Q, Li Y, Zhong D, Zhou N, Chang X, Li C, et al. Insecticide resistance of *Anopheles sinensis* and *An. vagus* in Hainan Island, a malaria-endemic area of China. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–9.
96. Maretasari G, Windusari Y, Lamin S, Hanum L, Septiawati D. Characteristics of Habitat, Distribution, and Diversity of *Anopheles* Spp in Kemelak Bindung Langit Village, Ogan Komering Ulu Regency, South Sumatra. *J Environ Sci Sustain Dev*. 2019;2(2):165–75.
97. Permadi IGWDS, Wibowo T, Wigati. *Anopheles Vagus* Sebagai Tersangka Vektor Di Indonesia. *Spirakel*. 2014;6(September):33–6.
98. Lobo V, Laumalay HM. Studi Laboratorium Siklus Hidup *Anopheles vagus* Pradewasa sebagai Vektor Filariasis dan Malaria di Provinsi Nusa Tenggara Timur. *Balaba J Litbang Pengendali Penyakit Bersumber Binatang Banjarnegara*. 2019;61–8.
99. Martins LMO, David MR, Maciel-de-Freitas R, Silva-do-Nascimento TF. Diversity of *Anopheles* mosquitoes from four landscapes in the highest endemic region of malaria transmission in Brazil. *J Vector Ecol*. 2018;43(2):235–44.
100. Dimas Novianto, Alya S, Kesumawati Hadi U, Soviana S. Distribution and The Habitat Characteristics of *Anopheles vagus* (Diptera: Culicidae) Larvae at Paddy Fields in The Vicinity of Dramaga IPB University Campus Dramaga Bogor West Java. *Acta Vet Indones*. 2021;(Spesial Issue):137–41.
101. Budiyanto A, Ambarita LP, Salim M. Konfirmasi *Anopheles sinensis* dan *Anopheles vagus* sebagai Vektor Malaria di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan. *Aspirator*. 2017;9(2):51–60.
102. Laurent B, Burton TA, Zubaidah S, Miller HC, Asih PB, Baharuddin A, et al. Host attraction and biting behaviour of *Anopheles* mosquitoes in South Halmahera, Indonesia. *Malar J*. 2017 Aug;16(1):1–9.
103. Surendran SN, Singh OP, Jude PJ, Ramasamy R. Genetic evidence for malaria vectors of the *Anopheles sudaicus* complex in Sri Lanka with morphological characteristics attributed to *Anopheles subpictus* species B. *Malar J*. 2010;9(1):343.
104. Kaur J. Reporting of morphological variations on wings and palpi of *Anopheles* (*Cellia*) *fluviatilis* James and *Anopheles* (*Cellia*) *vagus* Donitz. *J Entomol Zool Stud*. 2016;4(1):402–4.

105. Anthony TG, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny of the Pyretophorus Series of Anopheles subgenus Cellia (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol.* 1999;24(2):193–205.
106. Zhang C, Luo C, Yang R, Yang Y, Guo X, Deng Y, et al. Morphological and molecular identification reveals a high diversity of Anopheles species in the forest region of the Cambodia–Laos border. *Parasites and Vectors.* 2022;15(1):1–17.
107. Davidson JR, Wahid I, Sudirman R, Small ST, Hendershot AL, Baskin RN, et al. Molecular analysis reveals a high diversity of Anopheles species in Karama, West Sulawesi, Indonesia. *Parasites and Vectors.* 2020;13(1):1–11.
108. Jatuwattana W, Saeung A, Taai K, Srisuka W, Thongsahuan S, Aupalee K, et al. Systematic studies of *Anopheles (Cellia) kochi* (Diptera: Culicidae): Morphology, cytogenetics, cross-mating experiments, molecular evidence and susceptibility level to infection with nocturnally subperiodic *Brugia malayi*. *Acta Trop.* 2020 May 1;205.
109. Songsawatkiat S, Baimai V, Thongsahuan S, Otsuka Y, Taai K, Hempolchom C, et al. Evidence to support a conspecific nature of allopatric cytological races of *Anopheles nitidus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Insect Sci.* 2014;14:287.
110. Saeung A, Baimai V, Thongsahuan S, Otsuka Y, Srisuka W, Taai K, et al. Cytogenetic, cross-mating and molecular evidence of four cytological races of *Anopheles crawfordi* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Cambodia. *C R Biol [Internet].* 2014;337(11):625–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069114001693>
111. Escobar D, Pérez F, Ortiz B, Fontecha G. PCR–RFLP assays for the identification of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) species circulating in Honduras. *Malar J [Internet].* 2023;22(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04494-6>
112. Montanez-Gonzalez R, Vallera AC, Calzetta M, Pichler V, Love RR, Guelbeogo MW, et al. A PCR-RFLP method for genotyping of inversion 2Rc in *Anopheles coluzzii*. *Parasites and Vectors.* 2021;14(1):1–10.
113. Kakavas K V. Sensitivity and applications of the PCR Single-Strand Conformation Polymorphism method. *Mol Biol Rep [Internet].* 2021;48(4):3629–35. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06349-2>

114. Qin Y, Li M, Cao Y, Gao Y, Zhang W. Molecular thresholds of ITS2 and their implications for molecular evolution and species identification in seed plants. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17695-2>
115. Ali RSM, Wahid I, Saingamsook J, Saeung A, Wannasan A, Walton C, et al. Molecular identification of mosquitoes of the *Anopheles maculatus* group of subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) in the Indonesian Archipelago. *Acta Trop*. 2019 Nov 1;199.
116. Chaiphongpachara T, Changbunjong T, Laojun S, Nutepsu T, Suwandittakul N, Kuntawong K, et al. Mitochondrial DNA barcoding of mosquito species (Diptera: Culicidae) in Thailand. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(9 September):1–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0275090>
117. Ciubotariu II, Jones CM, Kobayashi T, Bobanga T, Muleba M, Pringle JC, et al. Genetic diversity of *Anopheles coustani* (Diptera: Culicidae) in malaria transmission foci in southern and central africa. *J Med Entomol*. 2020;57(6):1782–92.
118. Wilai P, Ali RSM, Saingamsook J, Saeung A, Junkum A, Walton C, et al. Integrated systematics of *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae) in the Oriental Region, with emphasis on forms in Thailand and Sulawesi, Indonesia. *Acta Trop*. 2020 Aug 1;208.
119. Gaudreau C, Larue B, Charpentier G. Suitability of COI , COII , 18S , and ITS2 for phylogeny and systematics of black fly (Diptera : Simuliidae). 2019;15.
120. Vipul Kumar YKS. To Develop Strain Specific Molecular Marker for Easy and Proper Identification of Fungal Species Based on Molecular Characters: A Review. *J Mol Biomark Diagn*. 2014;05(03).
121. Kang Z, Zhang L, Wang Y, Zhang X. Comparative analysis of different mitochondrial genes as DNA barcodes for identifying *Anopheles* mosquitoes. 2023 Dec 20;40:37–43.
122. Hao YJ, Zou YL, Ding YR, Xu WY, Yan ZT, Li XD, et al. Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and comparative evolutionary mitochondriomics of 50 mosquitoes. *Sci Rep*. 2017;7(1):7666.
123. Sallum MAM, Foster PG, Li C, Sithiprasasna R, Wilkerson RC. Phylogeny of the *Leucosphyrus* Group of *Anopheles* (*Cellia*) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial gene sequences. *Ann Entomol Soc*

- Am. 2007;100(1):27–35.
124. Sara El-Metwally; Ouda OMHM. Sequencing Technologies and Challenges in Sequence Assembly. Springer; 2014. 1–123 p.
 125. Mount DW. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis. Cold Spring Harbor Laboratory New York Press. 2001. 1–565 p.
 126. Damayanti PAA, Astawa INM, Adi AAAM, Sudarmaja IM, Swastika IK, Laksemi DAAS, et al. Mosquito-specific viruses (family Flaviviridae, genus Flavivirus) Diisolasi pada Nyamuk Anopheles vagus di Bali. J Vet. 2021;22(2):189–97.
 127. Mount DW. Choosing a method for phylogenetic prediction. Cold Spring Harb Protoc. 2008;3(4).
 128. Akhsani F, Hamidy A, Farajallah A, Smith EN. Hubungan Filogenetik Phrynella Pulchra Boulenger, 1887 Berdasarkan Gen 16s Rrna. Zoo Indones. 2017;26(2):107–15.
 129. Nascimento FF, Reis M, Yang Z. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A biologist ' s guide to Bayesian phylogenetic analysis. Nat Ecol Evol. 2018;2017(10):1446–54.
 130. Jacques F, Bolivar P, Pietras K, Hammarlund EU. Roadmap to the study of gene and protein phylogeny and evolution—A practical guide [Internet]. Vol. 18, PLoS ONE. 2023. 1–35 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0279597>
 131. Pavlopoulos GA, Soldatos TG, Barbosa-Silva A, Schneider R. A reference guide for tree analysis and visualization. BioData Min. 2010;3(1):1–16.
 132. Mount DW. The maximum likelihood approach for phylogenetic prediction. Cold Spring Harb Protoc. 2008;3(4).
 133. Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. Nat Rev Genet [Internet]. 2012;13(5):303–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3186>
 134. Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc R Soc B Biol Sci. 2003;270(SUPPL. 1):96–9.
 135. Hubert N, Hanner R. DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. DNA Barcodes. 2016;3(1).

136. Pemerintah Kabupaten Muara Enim. Website Resmi Kabupaten Muara Enim [Internet]. 2019. Available from: <https://muaraenimkab.go.id/web>
137. Sunarsih E, Zulkarnain M, Hanum L, Flora R, Damiri N. Spatial pattern analysis of malaria cases in muara enim regency using moran index and local indicator spatial autocorrelation. *Open Access Maced J Med Sci*. 2021;9:695–701.
138. Pemerintah Kabupaten Pesawaran. Wilayah Geografis Pesawaran [Internet]. 2022. Available from: https://pesawarankab.go.id/Profil_Pesawaran/wilayahgeografis
139. Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran. Profil Kesehatan Kabupaten Pesawaran. Pesawaran: Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran; 2016.
140. World Health Organization. Malaria entomology and vector control. Geneva: World Health Organization; 2013.
141. Ow Yang CK, Sta Maria FL WR. Maintenance of a laboratory colony of *Anopheles maculatus* Theobald by artificial mating. 1963.
142. Keven JB, Artzberger G, Gillies ML, Mbewe RB, Walker ED. Probe-based multiplex qPCR identifies blood-meal hosts in *Anopheles* mosquitoes from Papua New Guinea. *Parasites and Vectors*. 2020;13(1):1–8.
143. Dusfour I, Blondeau J, Harbach RE, Vythilingham I, Baimai V, Trung HD, et al. Polymerase chain reaction identification of three members of the *Anopheles sunaicus* (Diptera: Culicidae) complex, malaria vectors in Southeast Asia. *J Med Entomol*. 2007;44(5):723–31.
144. Linton YM, Harbach RE, Seng CM, Anthony TG, Matusop A. Morphological and molecular identity of *Anopheles* (*Cellia*) *sunaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. *Syst Entomol*. 2001;26(3):357–66.
145. Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol*. 1996;5(1):1–9.
146. Abascal F, Zardoya R, Telford MJ. TranslatorX: Multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(SUPPL. 2):7–13.
147. Nirwan M, Hadi UK, Soviana S, Satrija F, Setiyaningsih S. Diversity, domination and behavior of mosquitoes in filariasis endemic area of

- Bogor District, West Java, Indonesia. *Biodiversitas*. 2022;23(4):2093–100.
148. Bashar K, Sarker A, Rahman S. Host preference and nocturnal biting activity of mosquitoes collected in Dhaka, Bangladesh. *Int J Mosq Res*. 2020;7(3):01–8.
 149. Sukendra DM, Shidqon MA. Gambaran Perilaku Menggigit Nyamuk *Culex* sp. sebagai Vektor Filariasis *Wuchereria Bancrofti*. *J Pena Med*. 2016;6(1):19–33.
 150. Mulyaningsih B, Umniyati SR, Hadisusanto S, Edyansyah E. Study on vector mosquito of zoonotic *Brugia malayi* in Musi Rawas, South Sumatera, Indonesia. *Vet World*. 2019;12(11):1729–34.
 151. Sukendra DM, Syafrianti SY. Perilaku Mencari Makan pada Nyamuk *Culex* sp. sebagai Vektor Penyakit Filariasis. *Higeia J Public Heal Res Dev*. 2019;3(3):504–12.
 152. Rund SSC, Labb LF, Benefiel OM, Duffield GE. Artificial light at night increases *aedes aegypti* mosquito biting behavior with implications for arboviral disease transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;103(6):2450–2.
 153. Harapan H, Michie A, Mudatsir M, Sasmono RT, Imrie A. Epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Indonesia: Analysis of five decades data from the National Disease Surveillance. *BMC Res Notes* [Internet]. 2019;12(1):4–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4379-9>
 154. Arif M, Tauran P, Kosasih H, Pelupessy NM, Sennang N, Mubin RH, et al. Chikungunya in Indonesia: Epidemiology and diagnostic challenges. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(6):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008355>
 155. Ratnasari A, Jabal AR, Rahma N, Rahmi SN, Karmila M, Wahid I. The ecology of *aedes aegypti* and *aedes albopictus* larvae habitat in coastal areas of South Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*. 2020;21(10):4648–54.
 156. Pratiwi R, Anwar C, Salni S, Hermansyah H, Novrikasari N. Keanekaragaman dan perilaku menggigit nyamuk sebagai vektor potensial filariasis di Kabupaten Banyuasin, Sumatera Selatan. *J Entomol Indones*. 2019;16(2):91.
 157. Pratiwi R, Huda A, Ghiffari A, Anwar C. Biting pattern and seasonality of filariasis vector of *mansonia* spp. In endemic area of banyuasin

- regency, South Sumatera, Indonesia. *Open Access Maced J Med Sci*. 2021;9(July):509–17.
158. Sitorus H, Budiyanto A, Ambarita LP, Hapsari N, Taviv Y. Keanekaragaman Spesies Nyamuk di Wilayah Endemis Filariasis di Kabupaten Banyuasin dan Endemis Malaria di Oku Selatan Species Diversity of Mosquito in Endemic Area of Lymphatic Filariasis in Banyuasin and Malaria Oku Selatan District. *Balaba*. 2015;11(2):97–104.
 159. Ondiba IM, Oyieke FA, Athinya DK, Nyamongo IK, Estambale BBA. Larval species diversity, seasonal occurrence and larval habitat preference of mosquitoes transmitting Rift Valley fever and malaria in Baringo County, Kenya. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019;12(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3557-x>
 160. Anwar C, Ghiffari A, Kuch U, Taviv Y. The Abundance of Mosquitoes (Family: Culicidae) Collected in an Altitudinal Gradient In South Sumatra, Indonesia. *Int Conf Agric Ecol Med Sci*. 2015;9–12.
 161. Landi P, Minoarivelo HO, Brännström Å, Hui C, Dieckmann U. Complexity and stability of ecological networks: a review of the theory. *Popul Ecol*. 2018;60(4):319–45.
 162. Jude PJ, Ramasamy R, Surendran SN. Bionomic Aspects of the *Anopheles subpictus* Species Complex in Sri Lanka. *J Insect Sci*. 2014;14(97):1–10.
 163. Nixon CP, Nixon CE, Arsyad DS, Chand K, Yudhaputri FA, Sumarto W, et al. Distance to *Anopheles sunaicus* larval habitats dominant among risk factors for parasitemia in meso-endemic Southwest Sumba, Indonesia. *Pathog Glob Health*. 2014 Dec;108(8):369–80.
 164. Widawati M, Nurjana M, Mayasari R. Perbedaan Dataran Tinggi dan Dataran Rendah terhadap Keberagaman Spesies *Anopheles* spp. di Provinsi Nusa Tenggara Timur. *Aspirator - J Vector-borne Dis Stud*. 2018 Dec;10(2 SE-Articles).
 165. Sanei-Dehkordi A, Soleimani-Ahmadi M, Jaberhashemi SA, Zare M. Species composition, seasonal abundance and distribution of potential anopheline vectors in a malaria endemic area of Iran: Field assessment for malaria elimination. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2795-x>
 166. Agyekum TP, Botwe PK, Arko-Mensah J, Issah I, Acquah AA, Hogarh JN, et al. A systematic review of the effects of temperature on anopheles

- mosquito development and survival: Implications for malaria control in a future warmer climate. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(14):1–22.
167. Trájer AJ. The potential effects of climate change on the populations of *Aedes punctor* (Diptera: Culicidae) in Hungary. *J Insect Conserv* [Internet]. 2022;26(2):205–17. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10841-022-00378-3>
 168. Tananchai C, Pattanakul M, Nararak J, Sinou V, Manguin S, Chareonviriyaphap T. Diversity and biting patterns of *Anopheles* species in a malaria endemic area, Umphang Valley, Tak Province, western Thailand. *Acta Trop* [Internet]. 2019;190:183–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.009>
 169. Bashar K, Tuno N. Seasonal abundance of *Anopheles* mosquitoes and their association with meteorological factors and malaria incidence in Bangladesh. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–10.
 170. Ayala D, Caro-Riaño H, Dujardin JP, Rahola N, Simard F, Fontenille D. Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. *Infect Genet Evol*. 2011/03/15. 2011 Jul;11(5):940–7.
 171. Jeon J, Kim HC, Klein TA, Choi KS. Analysis of geometric morphometrics and molecular phylogeny for *Anopheles* species in the Republic of Korea. *Sci Rep* [Internet]. 2023;13(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49536-w>
 172. Qiao L, Du M, Liang X, Hao Y, He X, Si F, et al. Tyrosine Hydroxylase is crucial for maintaining pupal tanning and immunity in *Anopheles sinensis*. *Sci Rep*. 2016;6(April):1–11.
 173. Nardini L, Holm I, Pain A, Bischoff E, Gohl DM, Zongo S, et al. Influence of genetic polymorphism on transcriptional enhancer activity in the malaria vector *Anopheles coluzzii*. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–14.
 174. Christiansen-Jucht CD, Parham PE, Saddler A, Koella JC, Basáñez MG. Larval and adult environmental temperatures influence the adult reproductive traits of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1053-5>
 175. Veerwal B, Prasad A. Laboratory rearing of *Anopheles Stephehi* (L .) to study the biology of the vector. *South Asian J Contemp Issues Res*. 2021;(November):1–7.

176. Agyekum TP, Arko-Mensah J, Botwe PK, Hogarh JN, Issah I, Dwomoh D, et al. Effects of elevated temperatures on the development of immature stages of *Anopheles gambiae* (s.l.) mosquitoes. *Trop Med Int Heal*. 2022;27(4):338–46.
177. Niain'ny Felamboahangy L, Kaiser ML, Zengenene MP, Okumu F, Munhenga G, Koekemoer LL. Optimisation of laboratory-rearing parameters for *Anopheles funestus* larvae and adults. *Acta Trop* [Internet]. 2023;238:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106785>
178. van Schoor T, Kelly ET, Tam N, Attardo GM. Impacts of Dietary Nutritional Composition on Larval Development and Adult Body Composition in the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*). *Insects*. 2020 Aug;11(535):1–15.
179. Carter TE, Yared S, Hansel S, Lopez K, Janies D. Sequence-based identification of *Anopheles* species in eastern Ethiopia. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2768-0>
180. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagnostic Investig*. 2020;32(6):767–75.
181. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci*. 2018;27(1):135–45.