

Identifikasi Molekuler Spesies *Anopheles* dan Deteksi *Plasmodium* pada *Anopheles* Asal Muara Emil, Muara Enim, Sumatera Selatan

(MOLECULAR IDENTIFICATION OF ANOPHELES SPECIES AND
 DETECTION OF PLASMODIUM IN ANOPHELES ORIGINATING
 FROM MUARA EMIL, MUARA ENIM, SOUTH SUMATRA)

**Dalilah¹, Gita Dwi Prasasty¹, Dwi Handayani¹,
 R Irpan Pahlevi², Sulfa Esi Warni²**

¹Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran,
 Universitas Sriwijaya Palembang,
 Jl. Dokter Muhammad Ali, Kemuning, Palembang,
 Sumatera Selatan, Indonesia, 30114

²Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan,
 Jl. Ahmad Yani KM.7, Baturaja Timur,
 Ogan Komering Ulu, Sumatera Selatan, 32111
 Email: dalilah@fk.unsri.ac.id

ABSTRACT

Anopheles mosquitoes, belonging to the tribe *Anophelini*, serve as primary vectors of malaria. Accurate identification of mosquito species and detection of *Plasmodium* parasites are essential for understanding transmission dynamics and supporting surveillance in regions certified as malaria-free. This study was aimed to explore the diversity of *Anopheles* spp. species, morphologically and molecularly through Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) analysis, and to identify the malaria agent *Plasmodium* spp., using molecular techniques. This study employed descriptive and laboratory-based approaches in Muara Emil Village, Muara Enim District, an area officially recognized for malaria elimination. Morphological examination and molecular analysis using barcoding species Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) DNA barcoding were conducted to identify mosquito species, while genus-specific primers were applied to detect *Plasmodium* spp. Mosquito samples were captured in 2024 in Mura Emil Village. Thirty-four intact *Anopheles* spp. were taken from storage stocks. The sample size was based on the largest population, with 17 *Anopheles* (*An.*) *sinensis* samples, 10 *An. vagus* samples, three *An. barbirostris* samples, three *An. kochi* samples, and two *An. tessellatus* samples. Mosquitoes were extracted with a commercial kit to obtain pure DNA. The DNA polymerase chain reaction (PCR) examination was performed with internal transcribed spacer 2 (ITS2) species barcoding. Electrophoresis results are positive if the band is visible at 700 bp. Sequencing analysis was performed using the 1stBASE[®] technique. Sequencing data was examined using the BLAST method to identify the species. Detection of *Plasmodium* spp. was performed using the nested PCR technique. Five *Anopheles* species were confirmed through combined morphological and molecular methods: *An. vagus*, *An. barbirostris*, *An. kochi*, *An. sinensis*, and *An. tessellatus*. No

Plasmodium spp. were detected in any specimens. The findings highlight that morphological and molecular examinations are complementary and inseparable in species identification of *Anopheles* mosquitoes. ITS2 barcoding proved effective in validating morphological results, thereby reinforcing its utility in entomological surveillance within malaria elimination settings.

Keywords: *Anopheles*, barcoding species, ITS2, molecular, surveillance

ABSTRAK

Anopheles adalah nyamuk tribus *Anophelini* yang berperan sebagai vektor malaria. Identifikasi spesies dan parasit *Plasmodium* pada tubuh nyamuk berperan penting dalam mengidentifikasi rantai transmisi dan upaya surveilans pada daerah yang telah berstatus eliminasi malaria. Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi keragaman *Anopheles* spp., secara morfologi maupun molekuler melalui analisis *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2), serta mengidentifikasi agen malaria *Plasmodium* spp., dengan teknik molekuler. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dan analisa laboratorium. Lokasi penelitian merupakan daerah yang telah mendapat sertifikat eliminasi Malaria di Desa Muara Emil Kabupaten Muara Enim. Dilakukan pemeriksaan morfologi dan molekuler dengan menggunakan penanda spesies *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) untuk mengidentifikasi spesies, dan deteksi *Plasmodium* spp menggunakan primer spesifik genus. Sampel nyamuk adalah hasil tangkapan tahun 2024 di Desa Mura Emil. *Anopheles* spp., utuh sebanyak 34 diambil dari stock penyimpanan. Besaran sampel berdasarkan populasi terbanyak, Sampel *Anopheles* (*An.*) *sinensis* 17 sampel, *An. vagus* 10 sampel, *An. barbirostris* tiga sampel, *An. kochi* tiga sampel, dan *An. tessellatus* dua sampel. Nyamuk diekstraksi dengan kit komersial untuk mendapatkan DNA murni. Pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) DNA dengan *barcoding species internal transcribed spacer 2* (ITS2). Hasil elektroforesis positif bila pita terlihat pada 700 bp. Analisis *sequencing* dilakukan dengan teknik 1stBASE®. Data *sequencing* diperiksa dengan metode BLAST untuk mengidentifikasi spesies. Deteksi *Plasmodium* spp., dilakukan dengan teknik *nested PCR*. Lima spesies nyamuk *Anopheles* teridentifikasi secara morfologi dan molekuler, yakni *An. vagus*, *An. barbirostris*, *An. kochi*, *An. sinensis*, dan *An. tessellatus*. Tidak ditemukan *Plasmodium* spp., pada nyamuk sampel penelitian ini. Pemeriksaan morfologi dan molekuler tidak dapat dipisahkan sebagai bagian dari pemeriksaan spesies nyamuk *Anopheles*. ITS2 sebagai *barcoding* DNA cukup efektif mengkonfirmasi pemeriksaan morfologi *Anopheles*.

Kata-kata kunci: *Anopheles*, penanda spesies, ITS2, molekuler, surveilans

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara di kawasan Asia Tenggara masih berstatus endemis malaria. Ada sebanyak 113 kabupaten/kota di Indonesia yang masih endemis malaria tersebar dari Sumatera hingga Papua (Kementerian Kesehatan RI, 2025). Terdapat enam kabupaten di Provinsi Sumatera Selatan yang masih berstatus daerah endemis rendah malaria, salah satunya adalah Kabupaten

Muara Enim (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Namun, sejak tahun 2025, Kabupaten Muara Enim dan lima kabupaten lainnya telah berhasil mencapai eliminasi malaria (Kementerian Kesehatan RI, 2025).

Malaria ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Tercatat sebanyak 80 spesies *Anopheles* di Indonesia, dengan 26 spesies di antaranya merupakan vektor malaria (Elyazar *et al.*, 2013; Lempang *et al.*, 2023). Pada beberapa kabu-

paten di Sumatera Selatan, nyamuk *An. nigerrimus*, *An. letifer*, *An. vagus*, *An. maculatus*, *An. sinensis*, *An. barbirostris*, dan *An. kochi* telah terkonfirmasi menjadi nyamuk vektor malaria di Sumatera Selatan dengan ditemukannya sporozoit *Plasmodium* pada tubuh nyamuk tersebut yang didapat dari wilayah Kabupaten Lahat, Muara Enim, dan Ogan Komering Ulu (OKU) Selatan (Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan, 2020). *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) merupakan penanda molekuler universal yang sering digunakan dalam analisis spesies dan kekerabatan (Wahyuni *et al.*, 2018). Setidaknya ada lebih dari 100 publikasi pemeriksaan molekuler spesies pada vektor menggunakan ITS2 (Beebe, 2018). Nukleus ITS2 memiliki wilayah yang sangat terkonservasi dan berevolusi lebih lambat dibandingkan dengan DNA mitokondria, khususnya pada area ITS (18S; 5,8S; dan 28S). Oleh karena itu, sekuens wilayah ini dapat dimanfaatkan sebagai penanda genetik untuk identifikasi spesies (Kakavas, 2021). Meski wilayah Sumatera Selatan, khususnya Kabupaten Muara Enim telah mengeliminasi malaria, surveilans entomologi tetap menjadi komponen penting dalam sistem kewaspadaan dini terhadap kemungkinan munculnya kembali transmisi lokal. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi keragaman spesies nyamuk *Anopheles* spp., secara morfologi maupun molekuler melalui analisis ITS2, serta mengidentifikasi agen malaria *Plasmodium* spp., dengan teknik molekuler sebagai bagian dari upaya surveilans entomologi di wilayah tersebut.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini adalah observasional deskriptif dengan analisis molekuler laboratorium. Lokasi penelitian merupakan daerah yang telah mendapat sertifikat eliminasi Malaria di Desa Muara Emil, Kecamatan Tanjung Agung, Kabupaten Muara Enim, Sumatera Selatan. Penelitian ini dilakukan pada bulan September–Desember 2024. Penangkapan nyamuk telah dilakukan pada

Juli–Agustus 2023, dengan nomor etik penelitian: 090-2023 dari FK Unsri. Seba-nyak 2785 nyamuk dari lima spesies berhasil dikumpulkan (Tabel 1), nyamuk utuh tersimpan pada silika gel yang ditempatkan pada suhu ruang dan spesiesnya telah diidentifikasi oleh Entomologis dari Laboratorium Kesehatan Masyarakat (Labkesmas) Baturaja, Sumatera Selatan.

Pemeriksaan molekuler dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya. Sampel nyamuk utuh *Anopheles* spp., secara acak diambil sebanyak 34 nyamuk individual berdasarkan urutan populasi terbanyak dari nyamuk tersimpan (Gambar 1), berturut-turut sebagai berikut: *An. sinensis* 17 sampel, *An. vagus* 10 sampel, *An. barbirostris* tiga sampel, *An. kochi* tiga sampel, dan *An. tessellatus* dua sampel. Nyamuk-nyamuk tersebut kemudian diekstraksi dengan teknologi silika memanfaatkan kit komersial (QIAamp DNA mini kit®, Qiagen NV, Venlo, Belanda) untuk mendapatkan sampel DNA murni. Pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) pada sampel dengan menggunakan DNA *barcoding species internal transcribed spacer 2* (ITS2). Kondisi *thermocycling* PCR menggunakan primer ITS2 yakni: denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* suhu 53°C selama 30 detik, *extension* suhu 72°C selama 30 detik, diikuti perpanjangan *extension* pada suhu 72°C selama 10 menit. Sampel diinte-pretasikan positif bila *band* terlihat pada 700 bp pada hasil elektroforesis. Analisis *sequencing* dilakukan dengan mengirim sampel hasil PCR ke suatu perusahaan pelayanan produk hayati (1stBASE®, Axil Scientific, Singapura). Data hasil *sequencing* diperik-sakan dengan metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) untuk mengidentifikasi spesies.

Deteksi *Plasmodium* spp., menggunakan primer metode *nested* PCR dilakukan dalam penelitian ini dengan primer universal rPLU1 (TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA) & rPLU5 (CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC) digunakan untuk PCR langkah pertama; rPLU3 (TTT TTA TAA

GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT) & rPLU4 (TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC) digunakan untuk *nested* PCR langkah kedua. Proses amplifikasi dilakukan menggunakan kit PCR (Promega®, Promega Co, Wisconsin, Amerika Serikat). Kondisi *thermocycling* untuk *nested* PCR pada tahap pertama dan kedua adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit. Tahap akhir berupa ekstensi pada 72°C selama 4 menit. Produk PCR yang diamplifikasi kemudian dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Bila pada *nested* PCR pertama positif ditemukan *band* pada 240 bp, maka dilanjutkan dengan primer spesifik primer pada *nested* PCR kedua untuk *P. vivax* (fVIV1 dan rVIV2) dan primer *P. falciparum* rFAL1 dan rFAL2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lima spesies berhasil diidentifikasi secara morfologi di lapangan, yaitu *An. sinensis*, *An. vagus*, *An. kochi*, *An. barbirostris*, dan *An. tessellatus*. Nyamuk *An. sinensis* dan *An. vagus* ditemukan paling dominan saat pengambilan sampel. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menemukan kedua spesies tersebut mendominasi hasil penangkapan di Kabupaten Muara Enim (Budiyanto *et al.*, 2017).

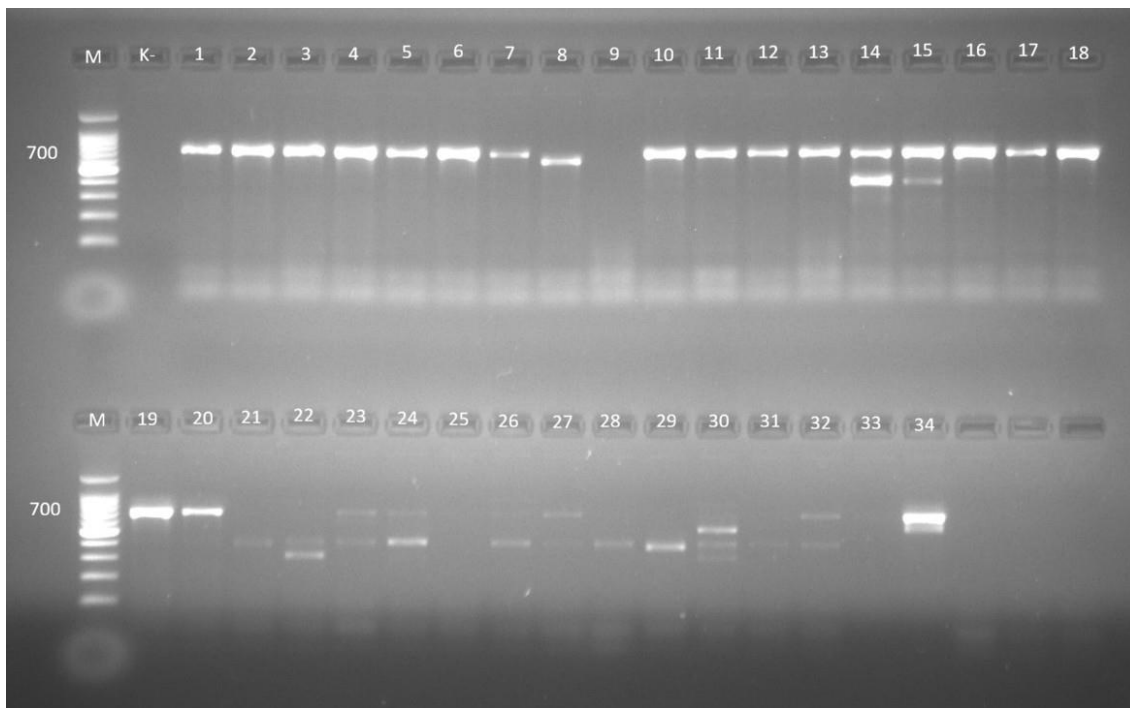
Sebanyak 34 sampel berturut-turut sebagai berikut: Sampel *An. vagus* (no 1-10), *An. barbirostris* (11-13), *An. sinensis* (14-30), *An. kochi* (31-32), *An. tessellatus* (33-34). Uji PCR dengan ITS2 menunjukkan pita pada 700 bp yang sangat jelas pada 20 sampel yang ditunjukkan oleh sampel nomer 1-8, 10-20, dan 34, sedangkan, sebanyak lima sampel menunjukkan pita yang samar pada titik 400 bp dan 700 bp (23, 24, 26, 27, 32); enam sampel menunjukkan pita pada kisaran 400-500bp (21,22,26,28,29,30), dan tiga sampel (sampel nomer 9, 25 dan 33),

sama sekali tidak menunjukkan adanya pita (Gambar 1). Sampel dengan pita yang jelas sebanyak 20 sampel, dan satu sampel (sampel nomer 24) pita samar di titik 400 dan 700 bp juga dikirim untuk analisis *sequencing*.

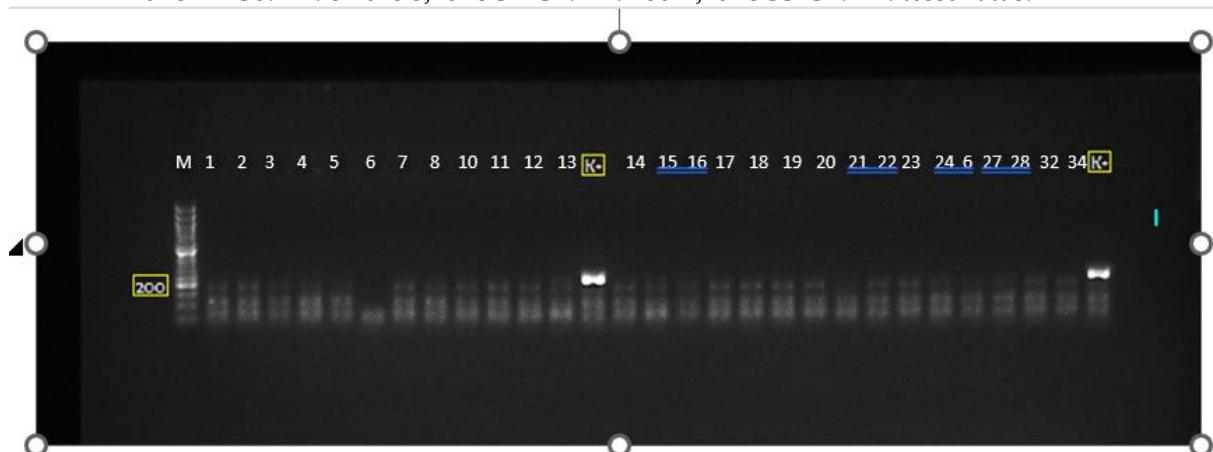
Hasil *sequencing* dari 20 sampel nyamuk yang diperiksa dengan PCR menunjukkan pita yang jelas dan teridentifikasi sebagai spesies yang sesuai dengan pemeriksaan morfologi. Namun, satu sampel dengan pita samar pada 700 bp (sampel nomor 24) hanya menunjukkan tingkat similaritas di bawah 95% ketika dilakukan analisis BLAST di NCBI, dan hasilnya berbeda dengan identifikasi morfologi (Tabel 2). Adanya pita samar dan pita ganda pada hasil elektroforesis sampel PCR dapat menunjukkan beberapa faktor seperti kadar *template* DNA yang kurang, degradasi sampel DNA, dan kontaminasi pada DNA (Green dan Sambrook, 2019; Lorenz, 2012). Pita samar dan ganda ini akan menghasilkan data *sequencing* yang tumpang tindih (*overlapping peaks*) sehingga pembacaan yang dilakukan saat pensejajaran dengan *sequence* referensi tidak optimal (Al-Shuhaib dan Hashim, 2023).

Pada sampel yang menunjukkan pita jelas pada target *base pair* yang dituju, memiliki makna bahwa hasil ekstraksi sampel memiliki kualitas yang baik. Oleh karena itu, sangat penting untuk menilai kemurnian DNA hasil ekstraksi serta menghitung konsentrasi atau jumlah *template* DNA sebelum dilakukan amplifikasi PCR (García-Alegría *et al.*, 2020).

Pemeriksaan morfologi, membutuhkan penguasaan keahlian dalam memeriksa secara rinci corakan yang khas dari *probosis*, *prehumeral* dan sayap (Wahyuni *et al.*, 2018), dari setiap nyamuk yang berbeda (Supriyono *et al.*, 2022). Kesalahan pada pemeriksaan morfologi dapat terjadi pada pemeriksaan nyamuk dengan kemiripan yang sangat tinggi seperti pada spesies *sibling* atau spesies kompleks (Laurent *et al.*, 2016; Van Bortel *et al.*, 2001). Pemeriksaan spesies dengan *barcoding* DNA ITS2 terbukti efektif membedakan inter dan intraspesies sehingga



Gambar 1. Hasil elektroforesis PCR ITS2 nyamuk *Anopheles* spp. Fragmen target ± 700 bp. M: DNA ladder 100 bp; K-: kontrol negatif; lane 1–10: *An. vagus*; lane 11–13: *An. barbirostris*; lane 14–30: *An. sinensis*; lane 31–32: *An. kochi*; lane 33–34: *An. tessellatus*.



Gambar 2. Hasil elektroforesis nested PCR deteksi *Plasmodium* spp. Fragmen target ± 240 bp. M: DNA ladder; K+: kontrol positif; K-: kontrol negatif; lane 1–34: sampel *Anopheles* spp

Tabel 1. Hasil Identifikasi spesies *Anopheles* secara morfologi dengan berbagai metode penangkapan di Desa Pulau Muara Emil Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan

Species	HLC			RD	RC		CBC		H
	UOD	UOL	Total (n)/%		RL	Total (n)/%	Total (n)	%	
<i>An. sinensis</i>	1	15	16/38,1	3	106	109/58,6	1780	63,9	0,823
<i>An. vagus</i>	3	18	21/50,0	0	68	68/36,6	900	32,3	
<i>An. kochi</i>	0	2	2/4,8	0	1	1/0,5	21	0,8	
<i>An. barbirostris</i>	0	3	3/7,1	0	8	8/4,3	50	1,8	
<i>An. tessellatus</i>	0	0	0/0	0	0	0/0	34	1,2	
Total	4	38	42/100	3	183	186/100	2785	100	

Keterangan: UOD: umpan orang dalam; UOL: umpan orang luar; ID: istirahat di dalam; IL: istirahat di luar.

Tabel 2. Perbandingan spesies *Anopheles spp* menurut pemeriksaan morfologi dan molekuler

No sampel	Morfologi	Molekuler (% Similaritas)	Hasil Akhir Identitas Spesies
1	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (99,60%)	<i>An. vagus</i>
2	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (100%)	<i>An. vagus</i>
3	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (100%)	<i>An. vagus</i>
4	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (100%)	<i>An. vagus</i>
5	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (99,80%)	<i>An. vagus</i>
6	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (99,79%)	<i>An. vagus</i>
7	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (100%)	<i>An. vagus</i>
8	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (100%)	<i>An. vagus</i>
10	<i>An. vagus</i>	<i>An. vagus</i> (100%)	<i>An. vagus</i>
11	<i>An. barbirostris</i>	<i>An. barbirostris</i> (99,70)	<i>An. barbirostris</i>
12	<i>An. barbirostris</i>	<i>An. barbirostris</i> (97,90)	<i>An. barbirostris</i>
13	<i>An. barbirostris</i>	<i>An. barbirostris</i> (99,70)	<i>An. barbirostris</i>
14	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,47)	<i>An. sinensis</i>
15	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,80)	<i>An. sinensis</i>
16	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,69)	<i>An. sinensis</i>
17	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,69)	<i>An. sinensis</i>
18	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,09)	<i>An. sinensis</i>
19	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,80)	<i>An. sinensis</i>
20	<i>An. sinensis</i>	<i>An. sinensis</i> (99,80)	<i>An. sinensis</i>
34	<i>An. tessellatus</i>	<i>An. tessellatus</i> (99,84)	<i>An. tessellatus</i>
24	<i>An. sinensis</i>	<i>An. lindesayi</i> (91,23%)	<i>An. sinensis</i>

lebih spesifik untuk membedakan variasi dalam *Anopheles species complex* (Beebe *et al.*, 2018; Chaiphongpachara *et al.*, 2022; Davidson *et al.*, 2020; Laurent *et al.*, 2017; Lestari *et al.*, 2016; Sindhania *et al.*, 2020; Syafruddin *et al.*, 2020; Zhong *et al.*, 2020). Penelitian ini tidak mendapatkan keberadaan *Plasmodium spp.* (Gambar 2). Nyamuk *Anopheles* merupakan inang definitif protozoa *Plasmodium spp.* Pada penelitian sebelumnya, ditemukan *P. falciparum* dan *P. vivax* pada tubuh nyamuk *An. vagus* dan *An. Sinensis* yang berasal dari desa yang sama di Kabupaten Muara Enim pernah terdeteksi (Budiyanto *et al.*, 2017). Deteksi *Plasmodium spp.*, sebagai survei dan *screening* entomologi pada nyamuk, memerlukan jumlah sampel yang cukup besar untuk meningkatkan peluang menemukan *Plasmodium spp.* Pada penelitian ini, dilakukan pemeriksaan terhadap sampel acak yang tersimpan dalam jumlah kecil, sehingga peluang ditemukannya *Plasmodium spp.*, menjadi lebih kecil. Meskipun demikian, ketiadaan *Plasmodium spp.*, dalam tubuh sampel nyamuk dapat juga menunjukkan bahwa langkah-langkah pencegahan penularan, seperti penggunaan kelambu, insektisida, dan pengendalian vektor terbukti efektif (Arjunan *et al.*,

2015; Chakim dan Pumpaibool, 2019; Multini *et al.*, 2020).

Seiring dengan jumlah populasi nyamuk *Anopheles spp.*, pada wilayah penelitian yang masih cukup tinggi, dapat menjadi dasar kewaspadaan untuk terus melakukan survei dan *screening* entomologi sebagai upaya pencegahan penularan malaria pada manusia di wilayah tersebut.

SIMPULAN

Kombinasi pemeriksaan morfologi dan molekuler melalui *barcoding* DNA ITS2 efektif dalam mengidentifikasi spesies *Anopheles*, serta membedakan variasi interspesies. Hasil *sequencing* menunjukkan identifikasi yang konsisten dengan pemeriksaan morfologi, dengan tingkat homolog sekuens DNA mencapai 99–100% terhadap sekuens referensi NCBI. *Plasmodium spp.*, tidak terdeteksi pada *Anopheles spp.*

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan agar penelitian selanjutnya dilakukan dengan jumlah sampel nyamuk yang lebih besar untuk meningkatkan peluang mende-

teksi *Plasmodium* spp.. Selain itu, penggunaan penanda genetik tambahan selain ITS2 dapat dipertimbangkan sehingga memperkuat akurasi identifikasi spesies dan mendeteksi kemungkinan variasi genetik yang lebih halus, seperti penanda gen mitokondria COI. Surveilans entomologi juga perlu dilaksanakan secara berkala di daerah dengan status eliminasi malaria untuk memantau dinamika populasi nyamuk serta memastikan pencegahan transmisi malaria tetap terjaga.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari Anggaran DIPA Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Nomor 023.17.2.677515/2024 tanggal 24 Nopember 2023 Sesuai dengan surat Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Nomor: 0854/UN9.FK/TU.SK/2024 tanggal 6 September 2024 dan surat penugasan Nomor: 082/S03/UN9.1.4/PLP-PPM/PL/VIII/2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shuhaib MBS, Hashim HO. 2023. Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic and Engeneering Biotechnology* 21: 115.
- Arjunan NK, Kadarkarai M, Kumar S, Pari M, Thiagarajan N, Vincent CT, Bernard DR. 2015. Factors influencing the spatial distribution of *Anopheles* larvae in Coimbatore District, Tamil Nadu, India. *Acta Tropica* 152: 121–130.
- Beebe NW. 2018. DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. *Parasitology* 145: 622–633.
- Budiyanto A, Ambarita LP, Salim M. 2017. Konfirmasi *Anopheles sinensis* dan *Anopheles vagus* sebagai Vektor Malaria di Kabupaten Muara Enim Provinsi Sumatera Selatan. *Aspirator* 9(2): 51–60.
- Chakim I, Pumpaibool T. 2019. The diversity of *Anopheles* blood feeding patterns suggests different malaria protection strategies in different localities. *F1000research* 8: 1217.
- Chaiphongpachara T, Changbunjong T, Laujun S, Nutepsu T, Suwandittakul N, Kuntawong K, Sumruayphol S, Ruangsittichat J. 2022. Mitochondrial DNA barcoding of mosquito species (Diptera: *Culicidae*) in Thailand. *PLoS One* 17(9): 1–27.
- Davidson JR, Wahid I, Sudirman R, Small ST, Hendershot AL, Baskin RN, Burton TA, Makuru V, Xiao H, Yu X, Troth EV, Olivieri D, Lizarraga S, Hasan H, Arfah A, Yusuf M, Nur N, Syafruddin D, Asih P, Lobo NF. 2022.
- Molecular analysis reveals a high diversity of *Anopheles* species in Karama, West Sulawesi, Indonesia. *Parasites and Vectors* 13(1): 1–11.
- Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan. 2020. Laporan Pelaksanaan Program Pencegahan dan Pengendalian Malaria Provinsi Sumatera Selatan. Palembang. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan..
- Elyazar IRF, Sinka ME, Gething PW, Tarmidzi SN, Surya A, Kusriastuti R, Winarno, Baird JK, Hay IH, Bangs MJ. 2013. The distribution and bionomics of *Anopheles* malaria vector mosquitoes in Indonesia. *Advance in Parasitology* 83: 173–266.
- García-Alegría AM, Anduro-Corona I, Pérez-Martínez CJ, Corella-Madueño MAG, Rascón-Durán ML, Astiazaran-García H. 2020. Quantification of DNA through the nanodrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry* 2020: 8896738.
- Green MR, Sambrook J. 2019. *Polymerase Chain Reaction*. Cold Spring Harbor Protocol. 19;2019(6):pdb.top095109. Cold Spring Harb Protocol. 2019(6). doi: 10.1101/pdb.top095109
- Kakavas KV. 2021. Sensitivity and applicati-

- ons of the PCR Single-Strand Conformation Polymorphism method. *Molecular Biology Report* 48(4): 3629–3635.
- Kementerian Kesehatan RI. 2020. Laporan Situasi Terkini Perkembangan Program Pengendalian Malaria di Indonesia Tahun 2019. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Laurent B, Burton TA, Zubaidah S, Miller HC, Asih PB, Baharuddin A, Kosasih S, Shinta, Firman S, Hawley WA, Burkot TR, Syafruddin D, Sukowati S, Collins FH, Lobo NF. 2017. Host attraction and biting behaviour of *Anopheles* mosquitoes in South Halmahera, Indonesia. *Malaria Journal* 16(1): 1–9.
- Lempang MEP, Permana DH, Asih PBS, Wangsamuda S, Dewayanti FK, Rozi IE, Syahrani L, Setiadi W, Malaka R, Muslimin L, Syafruddin D. 2023. Diversity of *Anopheles* species and zoonotic malaria vector of the Buton Utara Wildlife Sanctuary, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Malaria Journal* 22(1): 1–10.
- Lestari S, Adrial A, Rasyid R. 2016. Identifikasi Nyamuk *Anopheles* sebagai Vektor Malaria dari Survei Larva di Kenagarian Sungai Pinang Kecamatan Koto XI Tarusan Kabupaten Pesisir Selatan. *Jurnal Kesehat Andalas* 5(3): 656–660.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments* 63: 1–14.
- Multini LC, de Souza AL da S, Marrelli MT, Wilke ABB. 2020. The influence of anthropogenic habitat fragmentation on the genetic structure and diversity of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: *Culicidae*). *Scientific Reports* 10(1): 1–13.
- Sindhania A, Das MK, Sharma G, Surendran SN, Kaushal BR, Lohani HP, Singh OP. 2020. Molecular forms of *Anopheles subpictus* and *Anopheles sundaicus* in the Indian subcontinent. *Malaria Journal* 19(1): 1–17.
- Laurent SB, Supratman S, Asih PBS, Bretz D, Mueller J, Miller HC, Baharuddin A, Shinta, Surya A, Ngai M, Laihad F, SyafruddinD, Hawley WA, Collins FH, Lobo NF. 2016. Behaviour and molecular identification of *Anopheles malaria* vectors in Jayapura district, Papua province, Indonesia. *Malaria Journal* 2016;15(1):1–9.
- Supriyono, Soviana S, Novianto D, Musyaffa MF, Tan S, Hadi UK. 2022. Morphological characteristic of malaria vector *Anopheles aconitus* (Family: *Culicidae*) revealed by advanced light and scanning electron microscope. *Biodiversitas* 23(7): 3546–3552.
- Syafruddin D, Lestari YE, Permana DH, Asih PBS, Laurent BS, Zubaidah S, Rozi IE, Kosasih S, Shinta, Sukowati S, Hakim L, Haryanto E, Mangunwardoyo W, Bangs MJ, Lobo NF. 2020. *Anopheles sundaicus* complex and the presence of *Anopheles epiroticus* in Indonesia. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(7): 1–16.
- Van Bortel W, Harbach RE, Ho Ding Trung, Roelants P, Backeljau T, Coosemans M. 2001. Confirmation of *Anopheles varuna* in Vietnam, previously misidentified and mistargeted as the malaria vector *Anopheles minimus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65(6): 729–732.
- Wahyuni I, Senjarini K, Oktarianti R, Wathon S, Nur Uswatul Hasanah L. 2018. Identifikasi Morfologi Spesies Sibling *Anopheles vagus vagus* dan *Anopheles vagus limosus* Asal Desa Bangsring, Banyuwangi. *Biosfer* 8: 27–31.
- Zhong D, Hemming-Schroeder E, Wang X, Kibret S, Zhou G, Atieli H, Lee MC, Afrane YA, Githeko AK, Yan G. 2020. Extensive new *Anopheles* cryptic species involved in human malaria transmission in western Kenya. *Scientific Reports* 10(1): 1–13.