

Studi Laboratorium Siklus Hidup *Anopheles vagus* Pradewasa sebagai Vektor Filariasis dan Malaria di Provinsi Nusa Tenggara Timur

A laboratory Study of the Pre-Adult Filaria and Malaria Vector, Anopheles vagus in East Nusa Tenggara Province

Varry Lobo*, Hanani Melangwala Laumalay
Loka Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Waikabubak
Jalan Basuki Rahmat KM 5, Puu weri - Sumba Barat, Nusa Tenggara Timur, Indonesia
* E_mail: varryama@gmail.com

Received date: 03-12-2018, Revised date: 10-06-2019, Accepted date: 13-06-2019

ABSTRAK

Anopheles vagus merupakan vektor penting dalam penularan malaria dan filariasis di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Tingginya kepadatan nyamuk selain oleh pengaruh lingkungan juga adanya dinamika populasi. Kelimpahan populasi nyamuk berfluktuasi mengikuti laju kelahiran dan kematian dalam siklus hidupnya. Tujuan penelitian untuk mengidentifikasi siklus kehidupan pradewasa *An. vagus*. Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan desain *cross sectional*. Sampel penelitian adalah *An. vagus* dari Kabupaten Manggarai Barat dan Kabupaten Kupang. Nyamuk ditangkap pada pukul 18.00-24.00 di sekitar kandang ternak (sapi dan kerbau) yang telah menghisap darah. Nyamuk dibawa ke Laboratorium Loka Litbangkes Waikabubak untuk diidentifikasi dan dikolonisasi. Data dikumpulkan melalui pengamatan perkembangan kehidupan nyamuk setiap jam menggunakan formulir pengamatan dan dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *An. vagus* mampu menghasilkan telur 42-184 butir sekali bertelur dengan angka penetasan 79%. Hasil pengamatan rentang waktu siklus hidup di laboratorium, telur 1-4 hari, larva 9-19 hari, dan pupa 1-8 hari. *Anopheles vagus* membutuhkan waktu rata-rata 57,2 menit untuk kawin dan rata-rata 13 jam untuk menghisap darah setelah proses perkawinan. Presentase kematian tertinggi pada tahap larva instar IV yaitu 28,05%. Perkembangan siklus hidup *An. vagus* pradewasa membutuhkan waktu 11-31 hari pada suhu 21,1°C dan kelembaban 74,3%. Larva instar IV paling banyak mengalami kematian.

Kata kunci: siklus hidup, *Anopheles vagus*, vektor

ABSTRACT

Anopheles vagus is one of the vectors that plays an essential role in malaria infection in East Nusa Tenggara, Indonesia. This vector's density is related to population dynamics and the environment. The high population density is fluctuated according to the birth and death rate of the mosquitos on their life cycle. This is an observational study that employed a cross-sectional design aimed to identify the life cycle of pre-adult *An. vagus* mosquitos. The sample was collected from Manggarai Barat and Kupang regions. Sample was taken from around cattle's cages between 6.00pm-12.00am and were the ones that have sucked cattle's blood. Identification and colonization were conducted in Loka Litbangkes Waikabubak Laboratory. Data was collected through an hourly observation form and then analyzed descriptively. The results indicated that an adult *An.vagus* could produce 42-184 eggs each time it laid eggs with 79% hatching rate succeed. The life cycle of an *An.vagus* under a controlled environment in the laboratory was as following phases: egg (1-4 days), larvae (9-19 days), pupa (1-8 days). *Anopheles vagus* needed an average of 57.2 minutes to mate and 13 hours to suck blood after the mating process. The highest death rate (28.05%) occurred in instar IV of larvae stage. Pre-adult of *An. vagus* needed 11-31 days in with the environment that conditioned at 21.1°C and 74.3% humidity for their development, while the highest death rate observed at instar IV.

Keywords: life cycle, *Anopheles vagus*, vector

PENDAHULUAN

Anopheles vagus adalah vektor penting dalam penularan malaria dan filariasis di Nusa Tenggara Timur (NTT). Hal ini terbukti dengan ditemukannya *Plasmodium* dan juga mikrofilaria pada tubuh *An. vagus*.^{1,2} Provinsi NTT menempati urutan ke tiga angka kejadian malaria terkonfirmasi mikroskopis dari tahun 2013-2016, sedangkan angka kejadian filariasis klinis menempati urutan pertama pada tahun 2015 (2.864 kasus).^{3,4}

Status *An. vagus* sebagai vektor berdampak terhadap luasnya daerah sebaran penyakit tular nyamuk. Hal ini dimungkinkan karena *An. vagus* tersebar merata di Provinsi NTT. Peta penyebaran vektor malaria di NTT menggambarkan *An. vagus* ditemukan diseluruh kabupaten dengan berbagai tipe ekologi.⁵

Kompetensi nyamuk sebagai vektor dipengaruhi oleh kerentanan nyamuk terhadap patogen atau parasit, *longevity* atau umur nyamuk, sifat antropofilik, dan kepadatan relatif nyamuk vektor.^{6,7} Kepadatan relatif nyamuk bergantung pada kondisi lingkungan meliputi suhu, kelembaban, curah hujan, kecepatan angin, dan predator. Apabila faktor-faktor lingkungan optimal maka kepadatan nyamuk akan tinggi dan berdampak pada peningkatan kasus malaria.⁸

Tingginya kepadatan nyamuk selain oleh pengaruh lingkungan juga adanya dinamika populasi. Kelimpahan populasi nyamuk berfluktuasi mengikuti laju kelahiran dan kematian dalam siklus hidupnya. Faktor penentu laju kelahiran meliputi fekunditas, fertilitas, dan rasio seks, sedangkan laju kematian merupakan jumlah kematian nyamuk selama periode waktu tertentu.⁹

Dalam rangka mendukung upaya pengendalian malaria di provinsi NTT, maka perlu dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mendapatkan informasi dasar mengenai siklus hidup *An. vagus* pradewasa berupa lama hidup tiap fase, presentase kematian, serta kemampuan bereproduksi. Sehingga dapat menjadi pedoman dalam program

pengendalian penyakit tular vektor yang efektif.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional. Sampel penelitian adalah nyamuk *An. vagus* yang ditangkap dari alam. Sampel *An. vagus* diambil dari Kabupaten Manggarai Barat dan Kabupaten Kupang. Pengamatan terhadap siklus hidup dilakukan setiap jam menggunakan instrument formulir pengamatan. Pengamatan siklus hidup *An. vagus* pradewasa dilakukan di Laboratorium Loka Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Waikabubak, pada bulan April-Mei tahun 2016.

Pengumpulan Telur *An. vagus*

Kegiatan pengamatan siklus hidup diawali dengan penangkapan nyamuk yang menghisap darah dan istirahat di sekitar kandang ternak (sapi dan kerbau) selama 6 jam pukul 18.00-24.00. Nyamuk yang telah ditangkap dibawa ke Laboratorium Loka Litbangkes Waikabubak untuk diidentifikasi dan dikolonisasi. Pemeliharaan di laboratorium tidak dipisahkan berdasarkan lokasi penangkapan. Larva nyamuk diperoleh dengan cara isolasi nyamuk betina yang *gravid* di dalam *monocup* beralaskan kertas saring, yang dasarnya diberi air sumur dengan volume 1/3 volume *monocup* dan bagian atasnya ditutup kain kasa. Tiap *monocup* diisi 1 ekor nyamuk *gravid* sehingga dapat diketahui jumlah telur per ekor. Telur nyamuk yang lengket pada kertas saring dihitung menggunakan mikroskop stereo.

Pemeliharaan Larva *An. vagus*

Telur nyamuk yang lengket pada kertas saring ditetaskan pada nampan plastik berukuran 36 cm x 28 cm x 5 cm. Nampan dilapisi dengan kertas saring dan diberi air sumur dengan volume 4 ml air per larva, selain itu juga diberi potongan rumput sebagai tempat berteduh. Memasukkan kertas saring yang berisi telur nyamuk, yang sebelumnya telah dihitung menggunakan mikroskop stereo ke

dalam nampan. Sampel telur yang digunakan adalah 1.000 butir telur dan untuk memudahkan proses observasi maka telur dipisahkan dengan perbandingan tiap nampan sebanyak 100 butir telur, sehingga diperoleh 10 nampan.

Hasil penetasan, larva diberi pakan berupa hati ayam, biskuit anjing, dan ragi dengan perbandingan (2:3:1) yang digerus sampai halus kemudian disaring dengan kain kasa.¹⁰ Pemberian pakan berbeda pada masing-masing nampan sesuai dengan tahap perkembangannya. Larva instar I dan II diberi 50 mg sekali dalam sehari sedangkan instar III dan IV sebanyak 50 mg pada pagi dan 50 mg pada sore hari. Pakan larva diberikan dengan cara ditaburkan secara merata pada permukaan air. Penggantian air pada nampan dilakukan tiap tiga hari sekali, agar air tidak keruh oleh endapan sisa pakan. Penelitian dilakukan dengan menghitung waktu dan jumlah nyamuk pradewasa yang hidup setiap hari sampai semua larva berkembang menjadi dewasa.

Pemeliharaan Pupa *An. Vagus*

Larva yang telah menjadi pupa dipindahkan dengan pipet untuk ditempatkan dalam *monocup* yang berisi air 1/3 volumenya dan bagian atas *cup* ditutup dengan kain kasa. Setelah menjadi nyamuk dipindahkan ke dalam kurungan nyamuk. Penelitian dilakukan dengan menghitung angka kematian pupa dan waktu menjadi nyamuk.

Pemeliharaan Nyamuk Dewasa

Pupa yang telah menjadi nyamuk dikoloni dalam kurungan berukuran 30 cm x 30 cm x 30 cm dan diberikan handuk basah pada bagian luarnya agar tetap lembab. Pakan nyamuk diberi larutan air gula 10% yang ditaruh dalam kapas dan diletakkan dalam botol. Sebagai pakan darah disediakan kelinci sebagai hewan umpan darah, yang diumpan selama dua jam per harinya (Pukul 19.00–21.00). Penelitian dilakukan dengan menghitung waktu dan angka kematian nyamuk.

Penentuan waktu kawin dan menghisap darah, digunakan 30 ekor nyamuk betina.

Nyamuk tersebut dipisahkan menjadi 30 kurungan, tiap kurungan diisi 1 ekor betina dan 3 ekor jantan dengan tujuan untuk memudahkan dalam pengamatan. Nyamuk dipuaskan dengan cara tidak memberi larutan gula. Pada pengamatan waktu kawin dan menghisap darah, kelinci sebagai pakan darah diumpan mulai pukul 18.00-24.00. Pengamatan dilakukan per jam tiap harinya. Waktu kawin dihitung setelah satu jam nyamuk keluar dari kepompong dan melakukan perkawinan. Waktu isap darah adalah waktu menusuk-menghisap darah untuk pertama kali setelah terjadinya perkawinan.

Analisis Data

Data siklus hidup *An. vagus* dianalisis secara deskriptif, menghitung persentase, dan dijelaskan secara narasi. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan No.LB.02.01/52 /023/2016 tanggal 01 Februari 2016.

HASIL

Perkembangan Tahapan Pradewasa *An. vagus*

Pengamatan terhadap siklus hidup larva *An. vagus* dilakukan pada kondisi laboratorium, yaitu suhu udara rata-rata 21,1°C dan kelembaban udara rata-rata 74,3%. Hasil peletakan telur secara *monocup* dari *An. vagus* yang *blood fed* dan pemeliharaan larva diperoleh informasi seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perkembangan Pradewasa *An. vagus* pada Kondisi Laboratorium.

| Tahap Perkembangan | Rata-rata |
|---------------------------|------------------|
| Bertelur | 42- 184 butir |
| Angka penetasan telur | 79 % |
| Kematian tahap larva (%) | |
| Instar I | 17,95 % |
| Instar II | 13,35 % |
| Instar III | 15,9 % |
| Instar IV | 28,05 % |
| Kematian tahap pupa (%) | 2 % |

Berdasarkan Tabel 1. dapat diketahui bahwa *An. vagus* dapat menghasilkan telur

rata-rata 108 butir per ekornya dengan angka penetasan 79%. Siklus pradewasa angka kematian tertinggi terjadi pada tahap larva, dimana kematian tertinggi terjadi pada instar IV.

Periode Perkembangan Nyamuk

Pengamatan terhadap periode perkembangan nyamuk dimulai sejak penetasan telur hingga pupa serta menghitung lamanya waktu kawin dan menghisap darah. Kondisi laboratorium saat pengamatan yaitu, suhu berkisar 19,1-27°C dan kelembaban berkisar 81-90%. Selengkapnya disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Periode Perkembangan *An. vagus* pada Kondisi Laboratorium

| Tahap Perkembangan | Waktu |
|--------------------|------------|
| Telur menetas | 1-4 hari |
| Larva | 9-19 hari |
| Pupa | 1-8 hari |
| Waktu kawin | 57,2 menit |
| Waktu isap darah | 13 jam |

PEMBAHASAN

Perbedaan jumlah telur per ekor nyamuk dapat disebabkan dari volume darah saat menghisap darah. Penelitian yang dilakukan terhadap *An. subpictus* juga menunjukkan jumlah telur yang dihasilkan bervariasi antara 46-156 butir (rata-rata 100 butir). Jumlah telur yang dihasilkan dari setiap nyamuk tergantung dari volume darah yang dihisap oleh nyamuk betina, semakin banyak volume darah yang dihisap, semakin banyak pula telur yang akan dihasilkan.¹¹ Penelitian di India juga menyatakan bahwa *Anopheles* sp. mampu bertelur mencapai 80-100 butir telur dalam sekali bertelur.¹²

Hasil penelitian menunjukkan angka penetasan telur tidak jauh berbeda dengan angka penetasan pada *An. aconitus* (70%) namun berbeda dengan *An. farauti*. Penelitian terhadap *An. farauti* di laboratorium, diketahui bahwa angka rata-rata telur yang tidak menetas hanya 13,53%. Perkembangan telur nyamuk dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya suhu, keadaan lambung yang

penuh darah dan pemuahan telur.^{10,13,14} Studi kolonisasi *An. darlingi* di laboratorium, dilakukan pengamatan terhadap telur *An. darlingi* yang tidak menetas menggunakan mikroskop diketahui karena telur tidak dibuahi dan telur yang telah dibuahi rusak.¹⁵

Telur *An. vagus* hanya membutuhkan waktu satu hari untuk menetas pertama kali setelah bersentuhan dengan air. Total waktu yang dibutuhkan hingga semua telur menetas adalah satu sampai empat hari. Penelitian lain terhadap *An. aconitus* yang dilakukan di laboratorium, ditemukan bahwa telur akan menetas setelah dua hari dimasukkan dalam air.¹³ Waktu tetas telur *Anopheles* tergantung suhu air, semakin tinggi suhu air (dalam batas tertentu) akan lebih cepat menetas menjadi instar. Keadaan air yang hangat menyebabkan perkembangan nyamuk lebih baik.⁸

Suhu berpengaruh terhadap laju perkembangan dan kelangsungan hidup dari telur/larva hingga dewasa. Suhu yang konstan menghasilkan tingkat penetasan yang lebih tinggi.¹⁶ Kisaran suhu 25°C-29°C merupakan suhu yang sesuai untuk perindukan larva nyamuk.¹⁷ Penelitian terhadap *An. gambiae* suhu optimal penetasan telur di laboratorium adalah 24°C -30°C.¹⁸

Setelah proses telur, nyamuk akan melewati empat tahap instar larva. Larva *An. vagus* dari instar I-IV di laboratorium membutuhkan waktu 9-19 hari hingga menjadi pupa. Penelitian ini tidak menghitung waktu berdasarkan instar. Waktu perkembangan larva *An. vagus* tergolong lambat jika dibandingkan larva nyamuk *Anopheles* lainnya yang dipelihara di laboratorium. Larva *An. aconitus* hanya membutuhkan 9-12 hari. Penelitian lain terhadap *An. aconitus* diperoleh hasil rata-rata panjang periode tahap pradewasa pada delapan siklus gonotrofik pada suhu kamar yaitu; instar I: 3,44 hari, instar II: 3 hari, instar III: 3 hari, dan instar IV: 3,94 hari sehingga pada tahap larva membutuhkan 13,38 hari.¹⁹

Kanibalisme terjadi pada tahap instar IV menyebabkan tingginya angka kematian pada tahap ini. Hal ini diketahui saat proses pengamatan, larva saling memangsa. Sisa jasad

larva diambil kemudian diperiksa dibawah mikroskop stereo untuk memastikan kejadian tersebut. Hasilnya diketahui terdapat potongan kepala larva instar IV. Kekurangan pakan dan kepadatan menyebabkan terjadinya kanibal. Penelitian di Universitas Camerino Italia, diketahui kanibalisme terjadi pada *An. stephensi* dimana adanya saling memangsa antar instar larva maupun instar yang paling tua terhadap yang muda.²⁰ Penelitian lain juga menemukan bahwa *An. gambiae* kanibalisme terhadap telur, serta larva instar pertama. Selain itu, larva instar ketiga dan terutama keempat mengkanibal larva instar pertama yang baru menetas. Ketersediaan makanan buatan tidak menghilangkan tetapi mengurangi kanibalisme selama beberapa jam pertama paparan.²¹

Angka kematian terkecil pada siklus *An. vagus* di air adalah tahap pupa. Pupa membutuhkan waktu satu sampai delapan hari hingga semuanya menjadi nyamuk dewasa. Rendahnya kematian pupa dikarenakan pada tahap ini pupa tidak membutuhkan makanan sehingga tidak memerlukan perawatan yang lebih. Waktu perkembangan pupa menjadi nyamuk sangat lambat jika dibandingkan dengan siklus hidup *An. aconitus*. Pada tahap ini terjadi proses pembentukan alat-alat tubuh nyamuk dewasa seperti alat kelamin, sayap, dan kaki. Tingkatan ini memerlukan waktu 1-2 hari. Setelah cukup waktu, dari pupa akan keluar nyamuk dewasa yang dapat dibedakan antara jantan dan betina dari alat kelaminnya.²²

Tidak ada beda antara waktu kawin *An. vagus* pada kondisi ruangan dengan di alam. Perkawinan nyamuk di alam biasanya terjadi setelah 24-48 jam setelah keluar dari pupa. Nyamuk yang baru keluar setelah bersentuhan dengan udara, tidak lama kemudian akan terbang dan mencari darah untuk makanannya.²² Jumlah sampel nyamuk yang teramati berhasil melakukan *swarming* adalah sama banyaknya dengan yang tidak kawin. Nyamuk yang berhasil melakukan *swarming* tidak semuanya menghisap darah. Kelemahan dalam penelitian ini adalah keberhasilan perkawinan hanya dilihat melalui terjadinya

swarming tanpa pemeriksaan keberadaan spermatozoa dalam *spermateca* nyamuk betina. Kondisi lingkungan sangat penting untuk keberhasilan perkawinan *Anopheles*, baik dari tinggi kurungan maupun pencahayaan. Pada spesies tertentu kandang pemeliharaan dengan ukuran 30 cm x 30 cm x 30 cm tidak mengurangi keberhasilan perkawinan, namun pada *An. quadriannulatus* dan *An. gambiae* tingkat inseminasi berkurang ketika ditempatkan di kandang ukuran 30 cm x 30 cm x 30 cm.²³

Tidak semua sampel nyamuk pengamatan menghisap pakan darah kelinci. Perilaku *An. vagus* pada tiap karakteristik wilayah berbeda beda dalam hal kesukaan darah maupun waktu menghisap darah. Beberapa sifat hematologis, termasuk komposisi biokimia dan kepadatan sel darah merah bervariasi antara setiap spesies vertebrata dan bisa mempengaruhi nilai gizi dan reproduksi nyamuk yang menyerapnya. Sumber pakan darah nyamuk sangat penting karena akan memudahkan produksi telur yang tinggi, baik untuk koloni rutin maupun untuk eksperimen.²⁴

Anopheles vagus pada kondisi laboratorium sudah mulai menghisap darah pada pukul 19.30. Beberapa penelitian menyatakan bahwa *An. vagus* lebih suka berada di luar rumah dan menggigit di waktu senja sampai dengan dini hari (eksofagik).^{25,26,27,28} Puncak aktivitas *An. vagus* menghisap darah dilapangan berbeda-beda yaitu terjadi pada pukul 22.00-23.00 (Kabupaten Kupang, NTT),²⁹ 02:00-03:00 (Aceh).³⁰

KESIMPULAN

Jumlah telur yang dihasilkan oleh *An. vagus* tidak berbeda dengan spesies *Anopheles* lainnya. Perkembangan siklus hidup *An. vagus* pradewasa pada suhu 21°C dan kelembaban 74,3% memerlukan waktu 11-31 hari. Tahap larva instar IV merupakan tahap yang paling banyak mengalami kematian. Kanibalisme terjadi pada tahap larva instar IV.

SARAN

Berdasarkan lama hidup *An. vagus* pradewasa, maka upaya pengendalian vektor harus dilakukan minimal dua kali seminggu berupa pembasmi sarang nyamuk, tidak membiarkan air tergenang lebih dari dua minggu, sedangkan genangan air yang lebih luas dapat dilakukan pemeliharaan ikan kepala timah, nila, dan lainnya sebagai predator larva nyamuk. Pada suhu yang lebih panas (21°C) kegiatan pengendalian vektor harus dilakukan setiap minggunya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Loka Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Waikabubak yang telah memberikan ijin serta arahannya dalam pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih juga kepada Kepala Puskesmas Tarus, Kepala Puskesmas Tablolong, Kepala Desa Poco Rutang, Kepala Desa Mata Air, Kepala Desa Lifuleo, Petugas Lapangan, Warga Desa Poco Rutang, Warga Mata Air, dan Warga Lifuleo, serta rekan-rekan peneliti dan litkayasa yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Riset khusus vektora (part of journey, for a dignity) periode II. Kementerian Kesehatan RI; 2016.
2. Adnyana NWD. Pemetaan kasus dan vektor filariasis di Pulau Sumba Provinsi Nusa Tenggara Timur. Waikabubak; 2014.
3. Kementerian Kesehatan RI. Profil kesehatan Indonesia tahun 2016. Kementerian Kesehatan RI; 2017.
4. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Situasi filariasis di Indonesia tahun 2015. Kementerian Kesehatan RI; 2016. 1-7 p.
5. Kazwaini M, Laumalay HM, Triana E, Tangkuyah JE. Pemetaan vektor malaria di Provinsi Nusa Tenggara tahun 2013. Laporan Penelitian. Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan RI; 2013.
6. Srikandi Y. Penentuan kapasitas vektorial *Anopheles* spp. di Desa Rejeki Kecamatan Palolo Kabupaten Sigi Sulawesi Tengah. *J Kesehat Masy.* 2015;3(1):213–28.
7. 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. *J Vektora.* 2016;8(1):23–30.
8. Pratama GY. Nyamuk *Anopheles* sp. dan faktor yang mempengaruhi di Kecamatan Rajabasa, Lampung Selatan. *Medical Journal of Lampung University.* 2015;4(1):20–7.
9. Hadi M, Tarwotjo U, Rahadian R. Biologi insekta entomologi. Yogyakarta: Graha Ilmu; 2009.
10. Munif A, Ariati Y. Tabel kehidupan *Anopheles aconitus* di laboratorium. *Media Litbang Kesehatan.* 2007;17(2):1–7.
11. Barodji, Sumardi, Suwaryono T, Rahardjo, Mujiono, Priyanto H. Beberapa aspek bionomik vektor malaria dan filariasis *Anopheles subpictus* grassii di Kecamatan Tanjung Bunga, Flores Timur, NTT. *Buletin Penelitian Kesehatan.* 2000;27(2):268–81.
12. Davidson G. The *Anophelines* of India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(5):630.
13. Barodji, Sularto T, Haryanto B, Widiarti, Pradhan GD, Shaw RF. Life cycle study of malaria vector *Anopheles aconitus* donitz in the laboratory. *J Bul Penelit Kesehat.* 1985;13(1):1–7.
14. Munif A, Sukirno M, Mardiana. Tabel kehidupan *Anopheles farauti* sebagai pendukung analisis epidemiologi penyakit tular vektor di laboratorium. *J Media Litbang Kesehat.* 2005;15(4):12–9.
15. Villarreal-treviño C, Vásquez GM, López-sifuentes VM, Escobedo-vargas K, Huayanay-repetto A, Linton Y, et al. Establishment of a free-mating, long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2015;14:227. doi: 10.1186/s12936-015-0733-0.
16. Davies C, Coetzee M, Lyons CL. Effect of stable and fluctuating temperatures on the life history traits of *Anopheles arabiensis* and *An. quadrimaculatus* under conditions of inter- and intra-specific competition. *J Parasites & Vectors.* 2016;9:342. doi: 10.1186/s13071-016-1630-2.

17. Sari WA, Setyaningrum E, Murwani S. Hubungan keragaman dan kepadatan plankton dengan kepadatan larva nyamuk *Anopheles* sp. vektor penyebab malaria di Desa Lempasing Kecamatan Padang Cermin Kabupaten Pesawaran. Prosiding seminar nasional pengembangan teknologi pertanian Politeknik Negeri Lampung; 2014. p. 332–42.
18. 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. *J Parasites & Vectors*. 2015;8:456. doi: 10.1186/s13071-015-1053-5.
19. Gunandini UKHDJ, Sugiarto SS. Effect of temperatures on pre-adult development and gonotrophic cycle of *Anopheles aconitus* (Diptera: *Culicidae*), malaria vector in Indonesia. Prosiding seminar hasil-hasil penelitian IPB 2009;2009. p. 384–92.
20. Porretta D, Mastrantonio V, Crasta G, Bellini R, Comandatore F, Rossi P, et al. Intra-instar larval cannibalism in *Anopheles gambiae* (s.s.) and *Anopheles stephensi* (Diptera: *Culicidae*). *J Parasites & Vectors*. 2016;9:566. doi: 10.1186/s13071-016-1850-5.
21. Huang J, Miller JR, Walker ED. Cannibalism of egg and neonate larvae by late stage conspecifics of (Diptera: *Culicidae*): implications for ovipositional studies. *J Med Entomol*. 2018;55(4):801-7. doi:10.1093/jme/tjy059.
22. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Modul entomologi malaria. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan; 2013.
23. Facchinelli L, Valerio L, Lees RS, Oliva CF, Persampieri T, Collins CM, et al. Stimulating *Anopheles gambiae* swarms in the laboratory: application for behavioural and fitness studies. *Malar J*. 2015;14:271. doi: 10.1186/s12936-015-0792-2.
24. Mamai W, Somda NSB, Maiga H, Juarez JG, Muosa ZAI, Ali AB, et al. Optimization of mosquito egg production under mass rearing setting: effects of cage volume, blood meal source and adult population density for the malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *Malar J*. 2017;16(41):1–10. doi: 10.1186/s12936-017-1685-3.
25. Kusuma U, Widyanto A. Deskripsi bionomik nyamuk *Anopheles* sp. di wilayah Kecamatan Parigi Kabupaten Pangandaran Provinsi Jawa Barat Tahun 2016. *Buletin Keslingmas*. 2016;35(4):278–396. doi: 10.31983/keslingmas.v35i4.3103.
26. Indriyati L, Sembiring WSR, Rosanji A. Keanekaragaman *Anopheles* spp. di daerah endemis malaria Desa Siayuh (trans) Kabupaten Kotabaru Provinsi Kalimantan Selatan. *Aspirator*. 2017;9(1):11-20.
27. 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.
28. Mahdalena V, Hapsari N, Ni'mah T. Keragaman jenis dan aktivitas mengisap darah *Anopheles* spp. di Desa Simpang Empat Kecamatan Lengkiti Ogan Komering Ulu Sumatera Selatan. *J Aspirator*. 2016;8(1):9-16.
29. Rahmawati E, Hadi UK, Soviana S. Keanekaragaman jenis dan perilaku menggigit vektor malaria (*Anopheles* spp.) di Desa Lifuleo, Kecamatan Kupang Barat, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur. *J Entomol Indones*. 2014;11(2):53–64. doi:10.5994/jei.11.2.53.
30. Muhammad R, Sovianan S, Hadi UK. Keanekaragaman jenis dan karakteristik habitat nyamuk *Anopheles* spp. di Desa Datar Luas, Kabupaten Aceh Jaya, Provinsi Aceh. *J Entomol Indones*. 2015;12(3):139-48. doi:10.5994/jei.12.3.139.

