

Analisis Filogenetik Ayam-Hutan Merah (*Gallus gallus*) Asal Sumatra Menggunakan Fragmen *D-loop* Mitokondria

Jarulis^{1*}, Hery Haryanto², Muhammad Aldiansyah Karisma³, Santi Nurul Kamilah²

¹Program Studi S-2 Biologi, FMIPA Universitas Bengkulu, Indonesia, 38371

²Program Studi S-1 Biologi, FMIPA Universitas Bengkulu, Indonesia, 38371

³Graduate Student, Program Studi S-2 Biologi, FMIPA Universitas Bengkulu, Indonesia, 38371

*Corresponding author: jarulis@unib.ac.id

Submitted:
20 Juni 2025

Revised:
30 October 2025

Accepted:
5 November 2025

Published:
21 November 2025

ABSTRAK

Populasi ayam hutan merah (*Gallus gallus*) di habitat alamnya mengalami penurunan yang cukup tajam. Fakta ini disebabkan oleh hilangnya hutan sebagai habitat spesies tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk menjelaskan komposisi nukleotida, situs nukleotida spesifik, jarak genetik, dan status filogenetik ayam hutan merah berdasarkan Fragmen *D-loop* DNA Mitokondria. Sampel darah diambil dari 20 individu ayam hutan merah dari Provinsi Bengkulu dan Sumatera Selatan pada periode Mei hingga November 2022. Isolasi DNA total dilakukan menggunakan Kit Protokol *Spin-Column* dari Qiagen. Replikasi DNA menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik. Hasil penelitian kami menunjukkan adanya pasangan basa nukleotida AT (65,76%) yang lebih tinggi dibandingkan GC (34,24%), dan hanya ditemukan satu situs nukleotida spesifik dari panjang sekuen nukleotida 478 bp yang dianalisis. Komposisi nukleotida relatif homogen antar individu, menandakan rendahnya divergensi mitokondria. Rata-rata jarak genetik intraspesies sangat rendah yaitu 0,1%, yang mengindikasikan homogenitas genetik populasi. Pohon filogenetik memperlihatkan satu *clade* monofiletik yang kuat untuk seluruh sampel *G. gallus* Sumatra, dengan nilai *bootstrap* 63 - 87%, serta pemisahan yang jelas dari *outgroup*. Rendahnya variasi genetik ini diduga terkait dengan isolasi populasi, ukuran populasi efektif kecil, serta tekanan ekologis akibat fragmentasi habitat. Temuan ini menegaskan bahwa populasi ayam hutan merah liar di Bengkulu dan Sumatera Selatan merupakan unit genetik penting yang perlu diprioritaskan dalam upaya konservasi dan pengelolaan plasma nutfah unggas lokal.

Kata Kunci: Filogenetik, Kehilangan habitat, Konservasi, Perburuan liar, *Phasianidae*

ABSTRACT

The population of red junglefowl (*Gallus gallus*) in its natural habitat has experienced a substantial decline, primarily due to the loss and degradation of lowland forests that serve as its primary habitat. This study aimed to examine the nucleotide composition, specific nucleotide sites, genetic distance, and phylogenetic status of the red junglefowl based on the mitochondrial DNA *D-loop* fragment. Blood samples were collected from 20 individuals originating from Bengkulu and South Sumatra Provinces between May and November 2022. Total DNA was extracted using the Qiagen Spin-Column Kit, and the target fragment was amplified through Polymerase Chain Reaction (PCR) using species-specific primers. Our results indicate a predominance of AT nucleotide pairs (65.76%) compared with GC pairs (34.24%), and only a single variable site was detected within the 478-bp

sequence analyzed. The nucleotide composition was relatively homogeneous across individuals, suggesting low mitochondrial divergence within the population. The mean intraspecific genetic distance was markedly low (0.1%), indicating limited genetic differentiation. Phylogenetic reconstruction revealed a strongly supported monophyletic clade for all *G. gallus* individuals from Sumatra, with bootstrap values ranging from 63% to 87%, and a clear separation from outgroup taxa. The low level of genetic variation is likely associated with population isolation, small effective population size, and ecological pressures driven by habitat fragmentation. These findings underscore that Red Junglefowl populations in Bengkulu and South Sumatra represent a genetically important unit that should be prioritized in conservation programs and the management of local poultry genetic resources.

Keywords: Conservation, Illegal hunting, Habitat loss, Phasianidae, Phylogenetic

How to cite :

Jarulis, Haryanto, H., Karisma, M.A., & Kamilah, S.N. (2025). Phylogenetic analysis of red junglefowl (*Gallus gallus*) from Sumatra based on mitochondrial D-loop fragments. *Konservasi Hayati*, 21(2), 166-180.

DOI: <https://doi.org/10.33369/hayati/v21i2/42783>

PENDAHULUAN

Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus*) merupakan spesies asli Asia Tenggara yang dikenal sebagai nenek moyang ayam peliharaan (*Gallus gallus domesticus*) (Nguyen-Phuc & Berres, 2018; Lawal *et al.*, 2020). Spesies ini menunjukkan dimorfisme seksual yang mencolok, dengan jantan berukuran lebih besar (± 70 cm) dibandingkan betina (± 42 cm) (MacKinnon *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2016). Jantan memiliki bulu leher panjang berkilau, terdapat taji pada kaki, jengger, gelambir, dan muka berwarna merah. Bulu pada tengkuk, penutup ekor, dan bulu primer berwarna biru perunggu, sementara mantelnya berwarna coklat berangan. Ekornya panjang dengan penutup sayap yang hitam kehijauan dan berkilau, sedangkan tubuh bagian bawahnya berwarna hijau gelap. Sementara itu individu betina memiliki warna bulu yang lebih kusam. Biasanya berwarna coklat suram dengan coretan hitam pada leher dan tengkuk (Eaton *et al.*, 2016; McGowan & Kirwan, 2020). Ayam hutan merah dari Sumatra Utara memiliki ciri khas bulu tengkuk yang lebih panjang, iris mata merah, paruh berwarna tanduk, dan kaki abu-abu kebiruan. Suara jantan menyerupai ayam peliharaan namun lebih tajam dan singkat. Sedangkan ayam hutan kelompok Sumatra Selatan dan Jawa bersuara lebih serak (MacKinnon *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2016).

Populasi ayam hutan merah di Sumatra menghadapi tekanan ekologis yang serius akibat deforestasi hutan dataran rendah, fragmentasi habitat, dan perburuan liar (Putranto *et al.*, 2017; Setianto *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2023; BirdLife International, 2024). Pulau Sumatra, merupakan salah satu pulau yang mengalami tingkat deforestasi yang tinggi (Claudino-Sales, 2018; Weiskopf *et al.*, 2019; Santoro *et al.*, 2023), wilayah Provinsi Sumatra Selatan dan Bengkulu termasuk yang mengalami kehilangan habitat hutan yang cukup luas. Kondisi ini tentunya berdampak langsung pada penurunan populasi dan distribusi berbagai spesies, termasuk populasi ayam hutan merah. Tekanan antropogenik seperti perburuan untuk konsumsi, perdagangan, dan persilangan dengan ayam peliharaan

turut mempercepat penurunan populasi ayam hutan merah (Setianto *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2023).

Ancaman terhadap ayam hutan merah tidak hanya terjadi di Sumatra, tetapi juga merupakan isu konservasi regional di Asia Tenggara. Spesies dalam famili Phasianidae secara konsisten teridentifikasi sebagai kelompok yang rentan terhadap tekanan antropogenik. Studi oleh Grainger *et al.* (2018) menyoroti bahwa hilangnya habitat akibat deforestasi serta ancaman hibridisasi dengan ayam domestik telah menempatkan populasi liar pada risiko tinggi. Tekanan manusia yang tinggi di wilayah Sunda Besar juga terbukti berdampak negatif terhadap kelimpahan spesies Phasianidae, termasuk ayam hutan merah (BirdLife International, 2024).

Sebagai sumber plasma nutfah bagi ayam lokal seperti ayam burgo, ayam hutan merah memiliki nilai konservasi dan genetika yang tinggi. Ayam burgo telah diidentifikasi sebagai ayam asli Bengkulu yang berpotensi menjadi rumpun tersendiri, namun saat ini menghadapi ancaman kepunahan akibat degradasi habitat dan minimnya informasi genetik. Penelitian molekuler terhadap populasi ayam hutan merah asal Sumatra, khususnya dari Provinsi Bengkulu, menjadi sangat penting untuk mendukung konservasi dan penetapan rumpun ayam lokal. Salah satu penanda genetik yang relevan adalah fragmen *D-loop* DNA mitokondria. Gen *D-loop* ini yang memiliki tingkat mutasi tinggi dan sangat informatif untuk analisis variasi intraspesifik, haplotipe maternal, dan sejarah populasi, struktur populasi, dan identifikasi subpopulasi (Bronstein *et al.*, 2018; Prakas *et al.*, 2025).

Walaupun masih sangat terbatas, beberapa studi molekuler tentang ayam *Gallus gallus* di Indonesia sudah pernah dilakukan. Hasil studi tersebut mengungkap adanya keberagaman genetik dari spesies ini. Sulandari dan Zein (2009) mengidentifikasi adanya 26 haplotipe spesifik ayam lokal Indonesia dari 72 haplotipe *D-loop* DNA mitokondria (mtDNA). Kamagi (2017) berhasil mengamplifikasi sekuens parsial dari gen *COI* dan *Cytochrome b* dari sampel darah ayam hutan merah Sulawesi Utara. Pandi *et al.* (2018) melaporkan keragaman genetik ayam hutan merah berdasarkan sekuens gen *Cytochrome b*. Utama *et al.* (2023) menemukan 10 SNP spesifik dan 12 haplotipe pada sekuens parsial gen *COI* (756 bp) ayam burgo, dan 2 haplotipe berdasarkan gen parsial *NDI* (450 bp) (Jarulis *et al.*, 2025). Sementara itu Muhsinin *et al.* (2025) menemukan bahwa ayam lokal di Indonesia memiliki heterozigositas yang rendah. Namun, hingga saat ini belum ada penelitian yang secara khusus menganalisis sekuens *D-loop* mtDNA pada ayam hutan merah asal Sumatra.

Ancaman introgresi (persilangan) genetik dari ayam domestik yang dilepas liarkan semakin memperkuat urgensi penelitian molekuler terhadap populasi liar ayam hutan merah. Studi genomik berskala besar juga menunjukkan bahwa banyak populasi ayam hutan merah di Asia Tenggara telah mengalami introgresi genetik, dengan 20–50% genom mereka berasal dari ayam domestik (Wu *et al.*, 2023). Oleh karena itu, analisis filogenetik berbasis sekuens *D-loop* sangat penting untuk mengidentifikasi tingkat kemurnian genetik, memetakan hubungan kekerabatan antar populasi, serta mendukung konservasi plasma nutfah unggas lokal Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan filogenetik ayam hutan merah asal Sumatra bagian selatan berdasarkan sekuens *D-loop*, sebagai langkah awal dalam penyusunan basis data genetik untuk konservasi, pengelolaan populasi, dan pengendalian perdagangan spesies ini di Indonesia.

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan dari Mei-November 2022. Sampel darah ayam hutan merah (AHM) dikoleksi langsung dari individu hidup milik masyarakat di Kabupaten Bengkulu Tengah (8 individu), Kabupaten Seluma, Bengkulu (4 individu) serta Kabupaten Musi Rawas Utara, Sumatra Selatan (8 individu).

Isolasi DNA Total

Sampel darah (0,1 - 0,5 ml) diambil melalui *vena ulnaris* menggunakan syringe steril ukuran 1 ml. Sampel darah tersebut dimasukkan ke dalam *vacutainer tube* yang telah berisi EDTA kemudian disimpan dalam *freezer* suhu -20 °C di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Bengkulu, hingga proses lebih lanjut dilakukan. Selanjutnya isolasi DNA total dari sampel darah dilakukan menurut prosedur *Spin-Column Protocol* menggunakan *Dneasy*®*Blood dan Tissue Kit cat no 69504 (50)*.

Amplifikasi dan Sequencing Fragmen *D-loop*

Amplifikasi fragmen *D-loop* dilakukan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Reaksi PCR dibuat dalam volume total 25 µl yang terdiri atas 12,5 µl PCR Master Mix GoTag® G2 Green 2x (mengandung Taq DNA polymerase, dNTP, MgCl₂, dan buffer), 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, 2 µl DNA template, dan 8,5 µl ddH₂O. DNA Primer yang digunakan adalah sepasang primer spesifik gen *D-Loop* yaitu *DNA primer forward* GGDLPF 5'-TGCGGAGTGCTATTCAAGTG-3' dan *DNA primer reverse* GGDLPB 5'-CGATTGTTTGTGAGGGGAGT-3' dengan target 477 pb.

Tabel 1. Jumlah Individu Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus*) yang Dianalisis

No	Sampel		Volume Darah (ml)	Asal Sampel
	Kode	Nama Spesies (individu)		
1.	AHM1	<i>G. gallus</i> (individu 1)	0,1 - 0,5	Seluma, Bengkulu
2.	AHM2	<i>G. gallus</i> (individu 2)	0,1 - 0,5	Seluma, Bengkulu
3.	AHM3	<i>G. gallus</i> (individu 3)	0,1 - 0,5	Seluma, Bengkulu
4.	AHM4	<i>G. gallus</i> (individu 4)	0,1 - 0,5	Seluma, Bengkulu
5.	AHM5	<i>G. gallus</i> (individu 5)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
6.	AHM6	<i>G. gallus</i> (individu 6)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
7.	AHM7	<i>G. gallus</i> (individu 7)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
8.	AHM8	<i>G. gallus</i> (individu 8)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
9.	AHM9	<i>G. gallus</i> (individu 9)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
10.	AHM10	<i>G. gallus</i> (individu 10)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
11.	AHM11	<i>G. gallus</i> (individu 11)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
12.	AHM12	<i>G. gallus</i> (individu 12)	0,1 - 0,5	Bengkulu Tengah
13.	AHM13	<i>G. gallus</i> (individu 13)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
14.	AHM14	<i>G. gallus</i> (individu 14)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
15.	AHM15	<i>G. gallus</i> (individu 15)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
16.	AHM16	<i>G. gallus</i> (individu 16)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
17.	AHM17	<i>G. gallus</i> (individu 17)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
18.	AHM18	<i>G. gallus</i> (individu 18)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
19.	AHM19	<i>G. gallus</i> (individu 19)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara
20.	AHM20	<i>G. gallus</i> (individu 20)	0,1 - 0,5	Musi Rawas Utara

Kondisi termal PCR diatur dengan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* 45 menit pada suhu 56-60°C dan 1 menit ekstensi pada suhu 72°C. Jumlah siklus 35x. *Post extension* dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit, dan diakhiri pada suhu 4°C untuk pendinginan. DNA hasil amplifikasi dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% di dalam larutan TAE 1x menggunakan *Submarine Electrophoresis*. Produk PCR yang berhasil diamplifikasi dikirim untuk proses *sequencing* di Laboratorium *First Base Malaysia* (melalui perusahaan jasa *sequencing* PT. Genetika Science, Indonesia).

Analisis Data

Hasil *sequencing* dalam format chromatogram (file AB1) dianalisis menggunakan perangkat lunak BioEdit dan MEGA X untuk proses *editing*, *trimming*, dan penyusunan konsensus sekuens. Penyelarasan sekuens *D-loop* (*forward* dan *reverse*) dilakukan menggunakan algoritma Clustal W. Sekuens tersebut kemudian digunakan untuk analisis filogenetik (Kumar *et al.*, 2018). Visualisasi *electropherogram* dan urutan nukleotida hasil *sequencing* dilakukan dengan *software* BioEdit. Data runutan nukleotida diperoleh selanjutnya disejajarkan dengan data urutan nukleotida jenis-jenis ayam dari *GenBank* untuk melihat identitas kecocokannya. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining Bootstrap* 1000 kali pengulangan dengan jarak genetik berdasarkan pada *Kimura 2-parameter* (K2P) (Tamura *et al.*, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variasi dan komposisi nukleotida intraspecies *Gallus gallus* (n=20) ditampilkan dalam Tabel 2. Pada aspek variasi fragmen, hasil analisis menunjukkan bahwa fragmen *D-loop* ayam hutan merah asal Sumatra memiliki jumlah situs konservatif yang sangat tinggi, yaitu 477 dari total 478 posisi nukleotida. Temuan ini sangat berbeda dengan hasil penelitian lain yang juga menggunakan fragmen *D-loop*, yang mana pada fragmen *D-loop* tersebut memperlihatkan variasi yang umumnya cukup tinggi, seperti pada temuan Guo *et al.* (2017) menggunakan gen *D-loop* ayam asal China, temuan Murunga *et al.* (2018) pada gen *D-loop* ayam mutiara (*Numida meleagris*), dan Jarulis *et al.* (2020) pada gen *D-loop* burung *Buceros rhinoceros*. Meskipun demikian, pada 20 sampel ayam hutan merah ini masih terdapat satu situs polimorfik (*variable site*) yang menandakan bahwa region *D-loop* yang digunakan tetap memiliki potensi untuk menyimpan variasi genetik.

Tingginya jumlah situs konservatif pada fragmen *D-loop* yang dianalisis ini diduga terkait dengan homogenitas genetik populasi lokal ayam hutan merah asal Sumatra (sampel asal Bengkulu dan Sumatra Selatan yang digunakan), ukuran sampel yang terbatas, serta kemungkinan bahwa fragmen yang diamplifikasi mencakup bagian *D-loop* yang lebih konservatif dan tidak berada pada segmen HVS-I yang paling *hiper-variabel*. Selain itu, tekanan ekologis seperti fragmentasi habitat dan ukuran populasi efektif yang rendah dapat menyebabkan hilangnya variasi genetik dan meningkatkan proporsi posisi yang terkonservasi. Menurut Baptista dan Domingues (2023); Nicholls *et al.* (2023), keberadaan *elemen regulatory* yang penting pada fragmen tersebut juga berpotensi menekan laju mutasi melalui *purifying selection* sehingga banyak situs tetap berada dalam kondisi stabil antar individu. Hal ini juga didukung oleh studi Clark *et al.* (2023), yang menganalisis lebih dari

300 spesies burung dan menemukan bahwa diversitas nukleotida mitokondria sangat berkorelasi dengan ukuran populasi efektif, yang pada gilirannya dipengaruhi oleh sebaran geografis dan ukuran area jangkauan.

Tabel 2. Situs Konservatif dan Bervariasi Gen *D-loop* Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus*) Asal Sumatra (478 bp)

Individu	Conserved	Situs Variasi			Komposisi Nukleotida (%)			
		Variable	Pi	S	A	T	G	C
<i>G. gallus</i> 1 (individu 1)	477	1	1	0	29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 2 (individu 2)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 3 (individu 3)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 4 (individu 4)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 5 (individu 5)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 6 (individu 6)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 7 (individu 7)					29,7	36,2	12,3	21,8
<i>G. gallus</i> 8 (individu 8)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 9 (individu 9)					29,7	36,2	12,3	21,8
<i>G. gallus</i> 10 (individu 10)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 11 (individu 11)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 12 (individu 12)					29,7	36,2	12,3	21,8
<i>G. gallus</i> 13 (individu 13)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 14 (individu 14)					29,7	36,2	12,3	21,8
<i>G. gallus</i> 15 (individu 15)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 16 (individu 16)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 17 (individu 17)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 18 (individu 18)					29,5	36,2	12,6	21,8
<i>G. gallus</i> 19 (individu 19)					29,7	36,2	12,3	21,8
<i>G. gallus</i> 20 (individu 20)					29,7	36,2	12,3	21,8

Mengacu pada temuan Eduardoff *et al.* (2017), Bronstein *et al.* (2018), Peng *et al.* (2021), serta Pham *et al.* (2023), daerah HVS-I (atau HVR-I) pada gen *D-loop* dikenal sebagai salah satu segmen paling *hyper-variable* dalam genom mitokondria. Bagian ini menunjukkan tingkat mutasi yang jauh lebih tinggi dibandingkan wilayah mitokondria lainnya, sehingga mampu menghasilkan pola keragaman nukleotida yang kaya dan beragam. Karakteristik tersebut membuat HVS-I sangat sensitif dalam mendeteksi perubahan genetik

antar populasi maupun antar individu dalam satu populasi. Namun berdasarkan data penelitian seperti terlihat pada Tabel 2, komposisi nukleotida fragmen *D-loop* sepanjang 478 bp pada ayam hutan merah asal Sumatra menunjukkan pola yang relatif konsisten di seluruh individu. Basa Timin (T) merupakan nukleotida dengan proporsi tertinggi, yaitu 36,2% pada hampir semua sampel, sedangkan Sitosin (C) dan Adenin (A) masing-masing berada pada kisaran 21,8% dan 29,5 - 29,7%. Sementara itu, basa Guanin (G) memiliki proporsi terendah, yaitu 12,3 - 12,6% di seluruh sampel yang dianalisis. Pola ini tampak berbeda bila dibandingkan dengan beberapa laporan mitogenom *Gallus* lainnya. Misalnya, analisis mitokondria ayam *huangshan black chicken* yang dilakukan oleh Jin *et al.* (2021) yang menemukan bahwa proporsi nukleotida yang cenderung lebih seimbang, yaitu A = 30,3%, T = 23,7%, C = 32,5%, dan G = 13,5%. Nilai yang tidak jauh berbeda juga dijumpai pada studi yang dilakukan Huang *et al.* (2014) mengenai ayam *wuhua three-yellow chicken*, pada laporan Peng *et al.* (2021) terkait ayam *huainan partridge*, serta Sutopo *et al.* (2024) pada ayam cemani. Perbandingan ini memperlihatkan bahwa komposisi basa T pada populasi ayam hutan merah liar asal Sumatra jauh lebih tinggi dibandingkan pola yang ditemukan pada berbagai kelompok ayam domestik, sementara proporsi G di kedua kelompok sama-sama rendah.

Perbedaan pola komposisi basa ini menguatkan bahwa wilayah *D-loop* sangat dipengaruhi oleh karakteristik spesies dan populasi yang mengandungnya. Ruokonen dan Kvist (2002) menegaskan bahwa dinamika mutasi dan struktur evolusi kontrol region pada burung dapat berbeda antar genus maupun antar populasi dalam satu spesies, sehingga menghasilkan bias nukleotida yang khas. Dengan demikian, tingginya proporsi T pada populasi ayam hutan merah asal Sumatra dapat merefleksikan sejarah evolusi lokal, tekanan lingkungan, atau pola struktur populasi yang menyebabkan frekuensi nukleotida tertentu meningkat melalui proses *genetic drift*, mutasi, atau seleksi. Selain itu, perbedaan mencolok antara komposisi nukleotida ayam hutan liar dan ayam domestik juga dapat berkaitan dengan riwayat domestikasi, seleksi buatan, serta pola hibridisasi yang umum terjadi pada ayam peliharaan, sehingga menghasilkan mitogenom dengan bias nukleotida yang berbeda. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa *D-loop* ayam hutan merah liar Sumatra memiliki dinamika evolusi yang unik dan dapat memberikan informasi penting mengenai sejarah genetik serta adaptasi populasi liar tersebut.

Jarak Genetik

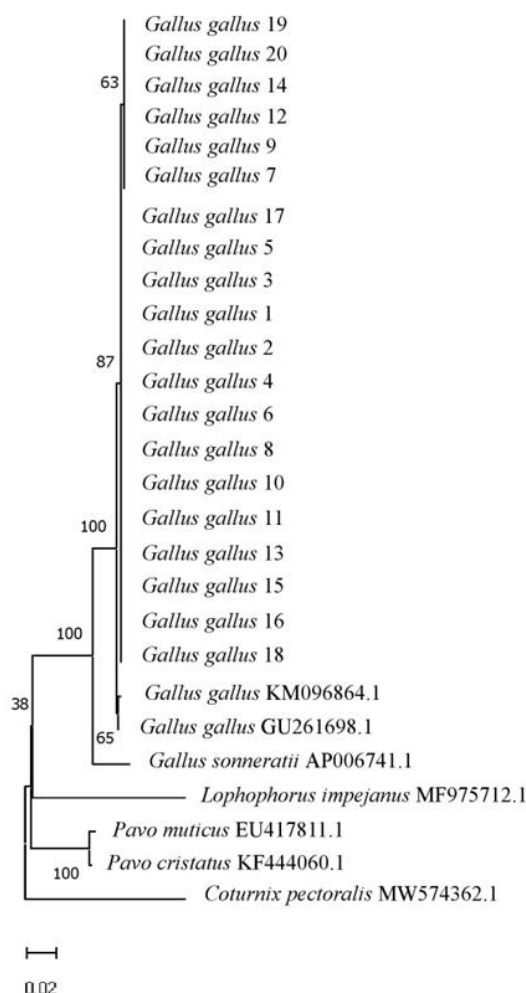
Data jarak genetik *D-loop* menunjukkan bahwa populasi *G. gallus* Sumatra memiliki tingkat divergensi genetik yang sangat rendah (Lampiran 1). Nilai jarak intrapopulasi berada pada kisaran 0,000 - 0,002 (0,00 - 0,20%), dengan rata-rata hanya 0,001 (0,10%), yang mengindikasikan bahwa individu-individu dalam populasi ini memiliki kemiripan sekuens mitokondria yang sangat tinggi. Ketika dibandingkan antarwilayah dalam Sumatra, nilai jarak interpopulasi tetap rendah, yakni 0,004 - 0,008 (0,40 - 0,80%) dengan rata-rata 0,0056 (0,56%). Hal ini menunjukkan bahwa aliran gen atau riwayat leluhur antar subpopulasi relatif homogen. Sebaliknya, jarak genetik antara *G. gallus* Sumatra dan *G. sonneratii* sebagai pembanding interspesies meningkat menjadi 4,30 - 4,60%, yang konsisten dengan perbedaan taksonomi antar spesies dalam genus yang sama. Jarak tersebut meningkat lebih jauh pada perbandingan antara *G. gallus* Sumatra dan kelompok *outgroup* lain, dengan

kisaran 9,80 - 17,20% (rata-rata 13,20%), yang menegaskan pemisahan evolusioner yang lebih dalam di antara taksa yang berasal dari garis keturunan berbeda. Secara keseluruhan, pola ini menunjukkan bahwa populasi ayam hutan merah *G. gallus* di Sumatra sangat homogen secara genetik, sementara jarak yang besar terhadap *G. sonneratii* dan *outgroup* mendukung validitas identitas spesies dalam kelompok Galliformes.

Temuan kunci penelitian ini adalah sangat rendahnya keragaman genetik intraspesies pada ayam hutan merah di Bengkulu dan Sumatra Selatan, yang tercermin dari jarak genetik rata-rata hanya 0,1%. Hasil ini sangat kontras dengan analisis *in silico* berskala besar yang dilakukan oleh Muttaqin *et al.* (2023), dan melaporkan bahwa keragaman haplogroup *D-loop* pada *Gallus* di Asia Tenggara berada dalam kategori sangat tinggi. Perbedaan tersebut memunculkan dua hipotesis utama. Pertama, populasi ayam hutan merah dari wilayah Sumatra bagian selatan mungkin merupakan populasi *relict* (sisir) yang telah lama terisolasi akibat fragmentasi habitat, sehingga mengalami penurunan keragaman genetik melalui *inbreeding* dan *genetic drift*. Pola ini konsisten dengan temuan Godinez *et al.* (2019) pada populasi ayam hutan di Pulau Samar, Filipina, yang menunjukkan keragaman nukleotida lebih rendah dibandingkan subspecies di daratan Asia. Hipotesis kedua adalah kemungkinan adanya introgresi dari ayam domestik, mengingat studi genomik Wu *et al.* (2023) mengungkapkan bahwa introgresi domestik dapat menjelaskan rendahnya keragaman alami pada populasi liar. Namun, pohon filogenetik kami memperlihatkan pengelompokan monofiletik yang rapat (*bootstrap* 65 -100) dan terpisah jelas dari *outgroup* ayam domestik (Gambar 1). Dengan demikian, penjelasan yang lebih memungkinkan adalah bahwa populasi yang dikaji merupakan populasi liar murni yang mengalami isolasi dan tekanan demografis jangka panjang, bukan hasil introgresi yang ekstensif.

Pohon Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogenetik dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan sekuens fragmen *D-loop* DNA mitokondria yang diperoleh dari sampel ayam hutan merah (*G. gallus*) asal Sumatra. Analisis dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1.000x untuk menguji tingkat kepercayaan pada setiap cabang filogenetik yang terbentuk. Hasil rekonstruksi yang ditampilkan pada Gambar 1 menunjukkan pemisahan yang jelas antara dua kelompok utama. Kelompok pertama terdiri atas 20 individu ayam hutan merah *G. gallus* yang dikoleksi dari wilayah Sumatra bagian selatan Indonesia, yang membentuk satu *clade* tersendiri. Sebagai pembanding, digunakan dua individu dari spesies *G. gallus* domestik, satu individu dari spesies berbeda namun masih dalam genus yang sama (*G. sonneratii*), serta empat sekuens dari spesies unggas lain yang berasal dari genus berbeda, yaitu *Pavo muticus*, *P. cristatus*, *Lophophorus impejanus*, dan *Coturnix pectoralis*, yang seluruhnya diperoleh dari basis data GenBank. Pemilihan *outgroup* ini sebagai pembanding bertujuan untuk memperkuat interpretasi terhadap posisi taksonomi dan kedekatan kekerabatan sampel ayam hutan merah yang diteliti.



Gambar 1. Pohon Filogenetik *Neighbor-Joining* 20 Individu *Gallus gallus* Asal Sumatra yang Direkonstruksi Menggunakan Model *K2P Bootstrap* 1000x Berdasarkan Gen *D-loop* (478 pb)

Pohon filogenetik yang dibangun menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000x ini menunjukkan pengelompokan yang jelas antara *G. gallus* asal Sumatra dan spesies *outgroup*, serta menegaskan homogenitas genetik dalam populasi yang diteliti. Seluruh sampel *G. gallus* Sumatra membentuk satu *clade* monofiletik yang kuat, dengan nilai *bootstrap* berkisar antara 63 - 100%. Nilai *bootstrap* yang relatif tinggi ini menunjukkan tingkat kepercayaan yang baik terhadap topologi pohon dan konsistensi hubungan kekerabatan antarindividu. Pengelompokan internal dalam *clade* Sumatra juga memperlihatkan struktur yang cukup rapat, di mana beberapa individu (misalnya nomor 19, 20, 14, 12, 9, dan 7) membentuk *subclade* yang stabil. Hal ini mengindikasikan adanya kedekatan genetik yang kuat di antara mereka. Pola serupa terlihat pada *subclade* lain yang mencakup individu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, dan 10, serta kelompok individu 11, 13, 15, 16, dan 18 yang memperlihatkan hubungan filogenetik sangat dekat dengan dukungan *bootstrap* 100%.

Di luar kelompok *G. gallus* Sumatra, pohon filogenetik ini menunjukkan pemisahan yang jelas dengan dua sekuens pembanding *G. gallus* dari GenBank (KM096864.1 dan GU261698.1), yang membentuk *clade* kecil tersendiri sebelum bercabang ke *G. sonneratii*. Jarak cabang yang lebih panjang antara sampel Sumatra dan *G. sonneratii* (AP006741.1)

menggambarkan divergensi genetik yang lebih besar antarspesies dalam genus *Gallus*. Lebih jauh lagi, cabang *outgroup* *Lophophorus impejanus*, *Pavo muticus*, *P. cristatus*, dan *Coturnix pectoralis* menunjukkan posisi filogenetik yang konsisten sesuai klasifikasi taksonomi Galliformes, dengan nilai *bootstrap* 100% yang mempertegas bahwa pemisahan ini sangat kuat secara evolusioner. Secara keseluruhan, topologi pohon filogenetik ini menegaskan bahwa populasi *G. gallus* di Sumatra bagian selatan merupakan kelompok yang homogen dan terisolasi secara genetik, dengan struktur *clade* yang konsisten dan diferensiasi yang jelas. Temuan ini mendukung dugaan bahwa populasi liar tersebut mengalami tekanan evolusioner lokal atau riwayat demografis yang menyebabkan rendahnya keanekaragaman genetik, sekaligus menegaskan pentingnya perlindungan populasi ini sebagai sumber plasma nutfah yang masih relatif murni.

Penggunaan analisis filogenetik sebagai pendekatan untuk menginterpretasikan hubungan evolusi antar individu didukung oleh berbagai penelitian terbaru. Zou *et al.* (2024) menegaskan bahwa pola percabangan dalam pohon filogenetik mencerminkan derajat kedekatan genetik, di mana individu dengan sekuens yang sangat serupa cenderung mengelompok dalam satu *clade* yang sama. Temuan ini sejalan dengan Wang (2022), yang menunjukkan bahwa klasterisasi yang konsisten dalam pohon filogenetik merupakan indikator kuat adanya hubungan kekerabatan maupun pola aliran gen antar populasi. Selain itu, Mo *et al.* (2023) menekankan pentingnya pemilihan *outgroup* sebagai pembanding untuk memastikan bahwa arah hubungan evolusioner dapat diidentifikasi dengan tepat. Dalam penelitian ini, analisis dilakukan terhadap 27 individu, terdiri atas 20 sampel dari Sumatra bagian selatan dan 7 sekuens *outgroup* dari GenBank, yang secara fungsional digunakan untuk memperjelas batas kekerabatan dan validitas struktur *clade* yang diperoleh.

Menariknya, studi terbaru di Sumatra Utara oleh Silalahi *et al.* (2024) yang menggunakan penanda *D-loop* pada ayam lokal ‘Mirah’ menemukan keragaman haplotipe yang tinggi dan menunjukkan introgresi dari dua subspecies ayam hutan merah, yaitu *G. g. gallus* dan *G. g. bankiva*. Temuan tersebut berbanding terbalik dengan hasil penelitian ini, di mana populasi liar ayam hutan merah di Sumatra Selatan menunjukkan keragaman genetik yang rendah. Perbedaan ini memperkuat argumen bahwa populasi liar yang diteliti merupakan sumber plasma nutfah yang kritis dan unik, berbeda dari ayam domestik yang telah mengalami pencampuran genetik secara luas. Dengan demikian, upaya konservasi terhadap ayam hutan merah di Provinsi Bengkulu dan Sumatra Selatan menjadi sangat penting, tidak hanya untuk menjaga keberadaan spesies liar tersebut, tetapi juga untuk melindungi kemurnian genetik yang menjadi dasar rumpun ayam lokal seperti ayam burgo.

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ayam hutan merah (*G. gallus*) asal Bengkulu dan Sumatra Selatan memiliki tingkat variasi genetik mitokondria yang sangat rendah berdasarkan analisis fragmen *D-loop* sepanjang 478 bp. Tingginya jumlah situs konservatif, homogenitas komposisi nukleotida, serta jarak genetik rata-rata yang hanya mencapai 0,1% menandakan bahwa populasi ini memiliki keragaman mitogenetik yang sempit. Struktur filogenetik yang terbentuk juga menunjukkan *clade* tunggal yang kuat dan terpisah jelas dari *outgroup*, sehingga mengindikasikan bahwa populasi ini relatif homogen dan tidak

menunjukkan tanda-tanda introgresi domestik yang signifikan. Rendahnya keragaman genetik ini kemungkinan disebabkan oleh isolasi populasi, ukuran populasi efektif yang kecil, serta tekanan ekologis akibat fragmentasi habitat yang luas di wilayah Sumatra bagian selatan. Perbandingan dengan studi lain yang melaporkan tingginya keragaman haplotipe pada ayam domestik atau populasi yang telah mengalami hibridisasi menunjukkan bahwa populasi liar yang diteliti merupakan plasma nutfah yang unik dan penting untuk dipertahankan. Oleh karena itu, upaya konservasi ayam hutan merah di Provinsi Bengkulu dan Sumatra Selatan sangat mendesak, baik sebagai langkah perlindungan spesies liar maupun sebagai dasar pelestarian sumber genetik unggas lokal seperti ayam burgo.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada FMIPA Universitas Bengkulu yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Penelitian Unggulan FMIPA tahun 2022. Apresiasi kami yang tinggi juga kami sampaikan kepada masyarakat pemerhati ayam hutan di Provinsi Bengkulu dan Sumatra Selatan yang telah bersedia memberikan sampel darah ayam yang dipelihara. Terima kasih juga kami haturkan kepada semua pihak yang telah ikut membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baptista, M., Domingues, L. (2023). Mitochondrial DNA D-Loop amplification and sequencing for species differentiation in milk. *In: Domingues, L. (eds) PCR. Methods in molecular biology*, vol 2967. Humana, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-0716-3358-8_14
- BirdLife International (2024). Species factsheet: Red junglefowl *Gallus gallus*. https://datazone.birdlife.org/species/factsheet/red-junglefowl-gallus-gallus?utm_source=chatgpt.com (diakses 16 Agustus 2025)
- Bronstein, O., Kroh, A. & Haring, E. (2018). Mind the gap! The mitochondrial control region and its power as a phylogenetic marker in echinoids. *BMC Evol Biol* 18(80), 1 – 15. DOI: 10.1186/s12862-018-1198-x
- Clark, A., Koc, G., Eyre-Walker, Y., & Eyre-Walker, A. (2023). What determines levels of mitochondrial genetic diversity in birds?. *Genome Biology and Evolution*, 15(5), evad064, 1 - 7. DOI: 10.1093/gbe/evad064
- Claudino-Sales, V. (2019). Tropical rainforest heritage of Sumatra, Indonesia. *In: Coastal world heritage sites. Coastal Research Library*, vol 28. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-024-1528-5_82
- Eaton, J.A., Balen, B.V., Brickle, N.W. & Rheindt, F.E. (2016). *Birds of the Indonesian Archipelago*. Greater Sundas and Wallace. Barcelona: Lynx Edicions.
- Eduardoff, M., Xavier, C., Strobl, C., Casas-Vargas, A., & Parson, W. (2017). Optimized mtDNA control region primer extension capture analysis for forensically relevant samples and highly compromised mtDNA of different age and origin. *Genes*, 8(10), 237, 1 – 17. DOI: 10.3390/genes8100237
- Godinez, C.J.P., Nishibori, M., Matsunaga, M., & Espina, D.M. (2019). Phylogenetic studies on red junglefowl (*Gallus gallus*) and native chicken (*Gallus gallus domesticus*) in

- Samar Island, Philippines using the Mitochondrial DNA D-Loop Region. *The Journal of Poultry Science*, 56(4), 237 - 244. DOI: 0.2141/jpsa.0180131.
- Grainger, M.J., Garson, P.J., Browne, S.J., McGowan, P.J.K., & Savini, T. (2018). Conservation status of Phasianidae in Southeast Asia. *Biological Conservation*, 220, 60–66. DOI: 10.1016/j.biocon.2018.02.005
- Guo, H.W., Li, C., Wang, X.N., Li, Z.J., Sun, G.R., Li, G.X., Liu, X.J., Kang, X.T., & Han, R.L. (2017). Genetic diversity of mtDNA D-loop sequences in four native Chinese chicken breeds. *British Poultry Science*, 58(5), 490–497. DOI: 10.1080/00071668.2017.1332403
- Huang, X.H., Zhong, F.S., Li, W.N., Chen, J.B., Zhang, A.X., & Yao, Q.F. (2016). Complete mitochondrial genome of the Wuhua three-yellow chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(2), 1311–1312. DOI: 10.3109/19401736.2014.945571
- Jarulis, Muslim, C., Solihin, D.D., Mardiasuti, A., & Prasetyo, L.B. (2020). Characters of mitochondrial DNA D-loop hypervariable III fragments of Indonesian Rhinoceros Hornbill (*Buceros rhinoceros*) (Aves: Bucerotidae). *Treubia*, 47(2), 99 – 110. DOI: 10.14203/treubia.v47i2.3971
- Jarulis, Ruyani, A., Nurmeiliasari & Utama, A. F. (2025). Genetic variation of burgo chicken from Bengkulu, Indonesia, based on the ND1 mitochondrial DNA gene. *Genetic Resources*, 6(12), 153–159. DOI: 10.46265/genresj.NZSL1498
- Jin, S., Zang, H., He, P., Jiang, T., Pan, S., & Geng, Z. (2021). Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of huangshan black chicken (*Gallus gallus*). *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 6(1), 243–244. DOI: 10.1080/23802359.2020.1860694
- Kamagi, D.D.W. (2017). Isolasi dan amplifikasi mtDNA ayam hutan merah dan ayam kampung (*Gallus gallus*) Sulawesi Utara. *Jurnal Sains. Matematika. & Edukasi*, 5(2), 162-167.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Lawal, R.A., Martin, S.H., Vanmechelen, K., Vereijken, A., Silva, P., Al-Atiyat, R.M., Aljumaah, R.S., Mwacharo, J.M., Wu, D.D., Zhang, Y.P., Hocking, P.M., Smith, J., Wragg, D., & Hanotte, O. (2020). The wild species genome ancestry of domestic chickens. *BMC Biology* 18(13), 1-18. DOI: 10.1186/s12915-020-0738-1
- MacKinnon, J., Philipps, K., & Balen, B. V. (2010). *Burung-burung di Sumatera, Jawa, Bali dan Kalimantan (termasuk Sabah, Sarawak dan Brunei Darussalam)*. Bogor: Puslitbang Biologi LIPI.
- McGowan, P.J.K. & Kirwan, G.M. (2020). Red junglefowl (*Gallus gallus*), Version 1.0. In *Birds of the World* (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D.A. Christie, and E. de Juana, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. DOI: 10.2173/bow.redjun.01
- Mo, Z.-Q., Wang, J., Möller, M., Yang, J.-B., & Gao, L.-M. (2023). Phylogenetic relationships and Next-Generation Barcodes in the genus *Torreya* reveal a high proportion of misidentified cultivated plants. *International Journal of Molecular*

- Molecular Sciences*, 24(17), 13216. DOI: 10.3390/ijms241713216
- Muhsinin, M., Maskur, M., Jan, R., Rozi, T., Kasip, LM, & Al Farizi, MS (2025). Identifikasi keragaman dan jarak genetik galur ayam lokal Indonesia berdasarkan gen miostatin. *Jurnal Biologi Tropis*, 25(1), 18–25. DOI: 10.29303/jbt.v25i1.8297
- Murunga, P., Kennedy, G.M., Imboma, T., Malaki, P., Kariuki, D., Ndiema, E., Obanda, V., Agwanda, B., Lichoti, J.K., & Ommeh, S.C. (2018). Mitochondrial DNA D-Loop diversity of the helmeted guinea fowls in Kenya and its implications on HSP70 gene functional polymorphism. *BioMed Research Internasional*, 2018, Article ID 7314038, 1 – 12. DOI: 10.1155/2018/7314038
- Muttaqin, Z., Sartika, T., & Saputra, F. (2023). Genetic diversity of *Gallus* sp. in Southeast Asia based on D-loop: *In silico* study. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 10(4), 817–819. DOI: 10.5455/javar.2023.j738
- Nguyen-Phuc, H., & Berres, M.E. (2018). Genetic structure in red junglefowl (*Gallus gallus*) populations: Strong spatial patterns in the wild ancestors of domestic chickens in a core distribution range. *Ecology and evolution*, 8(13), 6575–6588. DOI: 10.1002/ece3.4139
- Nicholls, T.J., Uhler, J.P., & Falkenberg, M. (2023). Mitochondrial DNA: Methods and protocols. *In* Methods in Molecular Biology (Vol. 2615). Springer. DOI: 10.1007/978-1-0716-2922-2
- Pandi, Z.M., Ngangi, J.W., & Worang, R.L. (2018). Analisis sekuens sebagian gen cytochrom b (cyt b) ayam hutan merah (*Gallus* sp.) Minahasa. *JSME (Jurnal Sains, Matematika & Edukasi)*, 5(2), 126-131.
- Peng, S.Y., Lu, M.X., Wang, M., Wang, L., Wang, C.Q., Wang, J.R., Zhang, Y.F., Zhang, H.J., & Li, J. (2021). The complete mitochondrial genome of huainan partridge chicken (*Gallus gallus*). *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 6(1), 99–101. DOI: 10.1080/23802359.2020.1847616
- Pham, L.D., Giang, T.T.N., Nguyen, V.B., Pham, T.P.M., Tran, T.T.T., Nguyen, T.Q.C., Van Nguyen, K., & Do, D.N. (2023). The complete mitochondrial genome and phylogenetic analyses of to chicken in Vietnam. *Genes*, 14(5), 1088, 1 – 11. DOI: 10.3390/genes14051088
- Prakas, P., Bea, A., Švažas, S., Vaitkuvienė, D., Stepanovas, D., & Butkauskas, D. (2025) Mitochondrial D-loop sequencing reveals lower genetic variability in feral pigeons (*Columba livia f. urbana*) than in woodpigeons (*Columba palumbus*) and european turtle doves (*Streptopelia turtur*). *Baltic Forestry*, 31(1), id779, 1 – 10. DOI: 10.46490/BF799
- Putranto, H.D., Hasibuan, G.P., Yumiati, Y., Setianto, J., Brata B., Kurniati, N., & Hakiki, F.F. (2017). The estimation of dynamical distribution of domesticated burgo chicken population in Bengkulu Coastal Area, Indonesia. *Biodiversitas*, 8(2), 458-464.
- Ruokonen, M., & Kvist, L. (2002). Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(3), 422-432. DOI: 10.1016/S1055-7903(02)00021-0

- Santoro, A., Piras, F. & Yu, Q. (2025). Spatial analysis of deforestation in Indonesia in the period 1950–2017 and the role of protected areas. *Biodivers Conserv* 34, 3119–3145. DOI: 10.1007/s10531-023-02679-8
- Setianto, J., Sutriyono., Prakoso, H., & Zain, B. (2016). Identifikasi asal-usul ayam hutan merah yang dipelihara masyarakat di Kabupaten Seluma. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 11(2), 141-152.
- Setianto, J., Zain, B., Sutriyono., & Prakoso, H. (2017). Domestication of red jungle fowl: A case study of the red jungle fowl chicks procurement by the communities in Central Bengkulu. Indonesia. *Biodiversitas*, 18 (1), 183 - 189. DOI: 10.13057/biodiv/d180124
- Silalahi, P., Sitorus, T.F., & Putra, W.P.B. (2024). Genetic characterization of sumatran mirah chicken based on mitochondrial D-loop region sequence. *HAYATI Journal of Biosciences*, 32(1), 196–202. DOI: 10.4308/hjb.32.1.196-202
- Sutopo, S., Lestari, D.A., Setiaji, A., Bugiwati, S.R.A., Dagong, M.I.A., Hilmia, N., Garnida, D., Asmara, I.Y., & Kurnianto, E. (2024). Revealing the complete mtDNA genome sequence of cemani chicken (*Gallus gallus*) by using Nanopore sequencing analysis. *Animal Bioscience. Asian Australasian Association of Animal Production Societies*, 37(10), 1664 – 1672. DOI: 10.5713/ab.23.0513
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120
- Utama, A.F., Jarulis, Sipriyadi, Jannah, I.M. (2023). DNA barcoding of burgo chicken from Bengkulu, Indonesia, based on the Cytochrome Oxidase Gene Sub Unit I mitochondria DNA. *Biodiversitas*, 24(11), 6256 - 6263. DOI: 10.13057/biodiv/d241148
- Wang, J. (2022). Editorial: Methods and applications in molecular phylogenetics. *Front. Genet.* 13:923409, 1 – 2. DOI: 10.3389/fgene.2022.923409
- Weiskopf, S.R., McCarthy, J.L., McCarthy, K.P., Shiklomanov, A.N., Wibisono, H.T., Pusparini, W. (2019). The conservation value of forest fragments in the increasingly agrarian landscape of Sumatra. *Environmental Conservation*, 46(4), 340 - 346. DOI: 10.1017/S0376892919000195
- Wu, M.Y., Forcina, G., Low, G.W., Sadanandan, K.R., Gwee, C.Y., van Grouw, H., Wu, S., Edwards, S.V., Baldwin, M.W., & Reindt, F. (2023). Historic samples reveal loss of wild genotype through domestic chicken introgression during the Anthropocene. *PLoS Genet* 19(1), e1010551, 1 – 19. DOI: 10.1371/journal.pgen.1010551.
- Zou, Y., Zhang, Z., Zeng, Y., Hu, H., Hao, Y., Huang, S., & Li, B. (2024). Common methods for phylogenetic tree construction and their implementation in R. *Bioengineering*, 11(5), 480, 1 - 22. DOI: 10.3390/bioengineering11050480

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	<i>G. gallus</i> 1																										
2	<i>G. gallus</i> 2	0.000																									
3	<i>G. gallus</i> 3	0.000	0.000																								
4	<i>G. gallus</i> 4	0.000	0.000	0.000																							
5	<i>G. gallus</i> 5	0.000	0.000	0.000	0.000																						
6	<i>G. gallus</i> 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																					
7	<i>G. gallus</i> 7	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002																				
8	<i>G. gallus</i> 8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002																			
9	<i>G. gallus</i> 9	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000																		
10	<i>G. gallus</i> 10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002																	
11	<i>G. gallus</i> 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000																
12	<i>G. gallus</i> 12	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000															
13	<i>G. gallus</i> 13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002															
14	<i>G. gallus</i> 14	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002														
15	<i>G. gallus</i> 15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000													
16	<i>G. gallus</i> 16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000												
17	<i>G. gallus</i> 17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000										
18	<i>G. gallus</i> 18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000									
19	<i>G. gallus</i> 19	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002								
20	<i>G. gallus</i> 20	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000							
21	<i>G. gallus</i> (KM096864.1)	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008	0.006	0.008	0.006	0.006	0.008	0.006	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008							
22	<i>G. gallus</i> (GU261698.1)	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.004	0.006	0.004	0.004	0.006	0.004	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.002						
23	<i>G. sonneratii</i> (AP006741.1)	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.046	0.043	0.046	0.043	0.046	0.043	0.046	0.043	0.046	0.043	0.043	0.043	0.046	0.046	0.046	0.043					
24	<i>Pavo muticus</i> (EU417811.1)	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.103	0.101	0.103	0.101	0.103	0.101	0.103	0.101	0.103	0.101	0.101	0.103	0.103	0.103	0.101	0.111				
25	<i>Pavo cristatus</i> (KF444060.1)	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.101	0.098	0.101	0.098	0.101	0.098	0.101	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.101	0.101	0.098	0.106	0.006			
26	<i>Lophophorus impejanus</i> (MF975712.1)	0.158	0.158	0.158	0.158	0.158	0.158	0.161	0.158	0.161	0.158	0.161	0.158	0.161	0.158	0.158	0.158	0.158	0.161	0.161	0.158	0.163	0.143				
27	<i>Coturnix coturnix</i> (MW574362.1)	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.172	0.169	0.172	0.169	0.172	0.169	0.172	0.169	0.169	0.169	0.169	0.172	0.172	0.166	0.163	0.177	0.150	0.153	0.212	