

Korelasi Virulen *gelE* dan Pembentukan Biofilm pada Isolat *Enterococcus faecalis* yang Diisolasi dari Ayam Pedaging

(Correlation of *gelE* Virulence and Biofilm Formation in *Enterococcus faecalis* Isolates from Chicken Origin)

Sucitya Purnama¹, Agustin Indrawati^{*}, I Wayan Teguh Wibawan¹, Rifky Rizkiantino¹

¹Divisi Mikrobiologi Medik, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (IPB University), Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16680

^{*}Penulis untuk korespondensi: Agustin Indrawati. Email: titin.seta@gmail.com

Diterima 8 Januari 2022, Disetujui 12 Juni 2022

ABSTRAK

Enterococcus faecalis merupakan patogen oportunistik yang membentuk biofilm dengan menghasilkan gen virulen seperti *gelE*. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi keberadaan *gelE* dan mengkaji korelasinya terhadap pembentukan biofilm pada isolat *E. faecalis* asal ayam. Sampel yang digunakan sebanyak 60 sampel arsip usap kloaka ayam. Isolasi dan identifikasi bakteri menggunakan media agar selektif diferensial KF *Streptococcus*. Konfirmasi molekuler menggunakan gen spesifik *Efac* untuk bakteri *E. faecalis* dan gen *gelE* untuk deteksi gen virulen gelatinase. Uji biofilm menggunakan teknik spektrofotometer pada densitas optik 630 nm. Data dianalisis secara kuantitatif menggunakan uji chi-square dengan nilai $P < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik. Hasil isolasi dan identifikasi bakteri terhadap 60 sampel arsip asal ayam pedaging yang digunakan dalam studi sebanyak 21 isolat positif terkonfirmasi secara molekuler sebagai bakteri *E. faecalis* dan memiliki gen virulen *gelE*. Pada uji biofilm terdapat sebanyak 20 isolat (95,23%) positif kuat ($OD_{630} > 0,130$) dan 1 (4,76%) positif lemah ($0,065 < OD_{630} \leq 0,130$) dengan nilai $P < 0,05$ atau memiliki korelasi secara statistik antara keberadaan gen *gelE* dengan pembentukan biofilm. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa gen virulen *gelE* telah ditemukan pada 21 isolat *E. faecalis* dan 95,23% mampu membentuk biofilm dengan intensitas positif kuat.

Kata kunci: Biofilm, *Enterococcus faecalis*, faktor virulen *gelE*

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a opportunistic pathogen known to form biofilms by producing virulent gene such as *gelE*. The aim of this study is to explore the presence of *gelE* and to examine its correlation to biofilm formation in the *E. faecalis* isolates from chicken origin. The samples used in this study were 60 samples of broiler cloacal swab archives. Isolation and bacteria were using a selective differential agar medium for KF *Streptococcus*. Molecular confirmation using the *Efac* specific gene for *E. faecalis* bacteria and *gelE* gene for detection of gelatinase virulent gene. Biofilm test was carried out using a spectrophotometer technique at an optical density of 630 nm. Data were analyzed quantitatively using the chi-square test with P-value $< 0,05$, which is considered statistically significant. The isolation and identification results on 60 samples from chicken used in 21 isolates were positively confirmed as *E. faecalis* bacteria and detected had the *gelE* virulent gene. In the biofilm test, there were 20 isolates (95.23%) strongly positive ($OD_{630} > 0.130$) and 1 isolates (4.76%) weak positive ($0.065 < OD_{630} \leq 0.130$) with P-value < 0.05 or correlate with the presence of the *gelE* gene and biofilm formation. It can be concluded that the virulent *gelE* gene was found in 21 isolates of *E. faecalis*, and 95.23% were able to form biofilms with strong positive intensity.

Keywords: biofilm, *Enterococcus faecalis*, *gelE* virulence factor

PENDAHULUAN

Enterococcus merupakan bakteri komensal saprofitik yang berperan sebagai flora normal yang berada di rongga mulut dan gastrointestinal manusia dan hewan (Franz *et al.*, 2011). Salah satu spesies dari genus *Enterococcus* yang sangat penting dan banyak dilakukan penelitian untuk dikaji adalah *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* merupakan bakteri Gram positif, katalase negatif, dan menunjukkan sifat nonhemolitik atau gamma-hemolitik apabila dikultur pada media agar darah domba 5% selama 24 jam (Al-Rammahi *et al.*, 2020). Bakteri ini pada manusia banyak dilaporkan dapat menyebabkan infeksi saluran urinaria dan infeksi nosokomial di rumah sakit pada pasien-pasien dengan kondisi immunosupresan, serta banyak dilaporkan telah resistan terhadap antibiotik vankomisin (O'Driscoll & Crank, 2015; Zheng *et al.*, 2018).

Enterococcus faecalis memiliki kemampuan dalam sekresi seng metaloprotease atau protease ekstraseluler yang mampu menghidrolisis gelatin, kolagen, kasein, hemoglobin, dan peptida lainnya (Waters *et al.*, 2003). Salah satu gen virulen yang bekerja dalam hal tersebut adalah gen *gelE* yang diketahui memiliki kemampuan dalam perlekatan bakteri, pembentukan biofilm (Soares *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2018), serta aktivitas gelatinase (Kiruthiga *et al.*, 2020).

Biofilm adalah komunitas mikroorganisme yang terstruktur dan kompleks yang menempel pada permukaan biotik atau abiotik (Bjarnsholt *et al.*, 2013). Biofilm merupakan salah satu strategi penting bagi mikroorganisme untuk bertahan hidup dalam kondisi yang merugikan dan berhubungan erat dengan kemampuan bakteri untuk menghindari pengobatan seperti antibiotik. Pembentukan biofilm pada *E. faecalis* adalah kompleks dan multifaktorial dan telah banyak dikaji pada isolat klinis asal manusia. Keterlibatan berbagai faktor virulen, terutama gen *gelE*, belum banyak dilaporkan pada isolat yang berasal dari hewan khususnya ayam. Untuk melengkapi celah kajian tersebut, studi ini dilakukan dengan tujuan mengeksplorasi keberadaan bakteri *E. faecalis* dan faktor virulen gelatinase yang dikodekan oleh gen virulen *gelE* serta mengkaji korelasinya terhadap pembentukan biofilm pada isolat *E. faecalis* asal ayam.

BAHAN DAN METODE

Studi ini menggunakan 60 sampel arsip usap kloaka ayam yang berasal dari Laboratorium Bakteriologi, Divisi Mikrobiologi Medik, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Sampel

arsip tersebut berasal dari usap kloaka ayam pedaging yang dikoleksi dari peternakan ayam pedaging di daerah Sukabumi, Indonesia. Adapun tahapan prosedur penelitian yang dilakukan, antara lain: isolasi dan identifikasi bakteri, konfirmasi secara molekuler dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), deteksi gen virulen *gelE*, serta karakterisasi fenotipik biofilm.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Bakteri diisolasi dengan dikultur pada media agar selektif diferensial KF *Streptococcus* (Merck KgaA, Darmstadt, Jerman). Koloni yang tumbuh dan mencirikan pada koloni *Enterococcus* (Wellinghausen *et al.*, 2009) kemudian dikultur kembali pada media selektif diferensial yang sama untuk memperoleh koloni murni.

Ekstraksi DNA Bakteri

Bakteri dari koloni murni diekstraksi untuk mendapatkan *template* DNA dengan menggunakan metode perebusan. Sebanyak satu hingga dua ose koloni bakteri yang berumur 24 jam asal media agar selektif diferensial KF *Streptococcus agar base* dicampurkan pada 100 µL *nuklease free water* (NFW) dalam tabung mikro 1,5 mL. Tabung mikro yang berisi suspensi bakteri tersebut dihomogenkan menggunakan vortex selama 5 menit kemudian suspensi direbus pada suhu 100°C selama 10 menit dan perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Suspensi disentrifugasi kembali pada 6.500 rpm selama 3 menit. Supernatan dikoleksi dan disimpan sebagai *template* DNA pada suhu -20°C hingga tahap PCR dilakukan (Rizkiantino *et al.*, 2020).

Konfirmasi Molekuler Isolat Bakteri Menggunakan Gen Spesifik *E. faecalis*

Amplifikasi menggunakan pasangan primer spesifik bakteri *E. faecalis* dengan primer *forward* (*Efac* F1) 5'-CGTTAGTAAC TGAACGTC-3' dan primer *universal reverse* (1492R) 16 sRNA 5'-GGATACCTTGTTAC GACTT-3'. Kombinasi primer mempunyai ampikon target sebesar 1022 bp. Total volume reaksi campuran 12,5 µL yang terdiri atas PCR master mix 11 µL (MyTaq HS Red Mix, Bioline), primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing 0,25 µL dengan konsentrasi 20 mM, dan *template* DNA sampel 1 µL. Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *BioRad T100™* CA, USA *Thermal Cycler* dengan parameter siklus: denaturasi awal 94°C selama 5 menit, 35 siklus dengan denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 48°C selama 40 detik,

elongasi 72°C selama 1 menit, dan elongasi akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR dianalisa pada 0.8% gel agarose (Thermo Scientific, (EU) Lithuania) dalam 1% Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer dan diwarnai dengan 0.5 µg/mL ethidium bromida. Bakteri *E. faecalis* ATCC 29212 digunakan sebagai kontrol positif. Produk amplifikasi divisualisasi dengan UV *transilluminator* (Pacific Image Electronics Co., Ltd., Taiwan). DNA Ladder (Promega, Madison, WI USA) 1 kb digunakan sebagai standar berat molekul (Rahman *et al.*, 2017).

Deteksi Gen Virulen *gelE*

Amplifikasi menggunakan pasangan primer gen virulen *gelE* dengan primer forward 5'-TATGACAATGCTTTTGGGA T-3' dan primer reverse 5'-AGATGCACCC GAAATAATATA-3'. Amplikon target sebesar 213 bp. Parameter PCR yang digunakan adalah denaturasi awal dengan suhu 95°C selama 3 menit, 30 siklus dengan suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 52°C selama 30 detik, elongasi 72°C selama 1 menit, dan elongasi akhir 72°C selama 10 menit (Vankerckhoven *et al.*, 2004).

Karakteristik Fenotipik Biofilm

Uji karakteristik fenotipik biofilm bakteri dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dengan menumbuhkan suspensi isolat yang telah terkonfirmasi sebagai *Enterococcus faecalis* yang memiliki gen *gelE*. Konsentrasi bakteri yang dibuat standar Mc Farland 7 atau setara dengan 2.1×10^9 CFU/mL diinokulasi

selama semalaman dalam 200 µL media kaldu *tryptic soy* yang mengandung 0,25% glukosa pada *polystyrene microtiter plate F-bottom, high binding* 96 sumur (Greiner Bio-One STRIP PLATE, MICROLON®). Sumur kontrol negatif biofilm tidak diinokulasikan bakteri dan hanya berisi media kaldu *tryptic soy* yang mengandung 0,25% glukosa. Sumur kontrol positif biofilm digunakan bakteri *E. faecalis* ATCC 29212. Setelah 24 jam inkubasi pada 37°C, supernatan dibuang dan *microtiter plate* dicuci sebanyak tiga kali dengan *phosphate buffered saline* (PBS). Koloni difiksasi menggunakan metanol 96% selama 30 menit, dilakukan pewarnaan dengan kristal violet 1% selama 30 menit, dan dibilas dengan akuades steril. Intensitas warna violet yang terbentuk kemudian dibaca absorbansinya dengan densitas optik pada 630 nm atau OD₆₃₀. Pengukuran absorbansi dikelompokkan menggunakan formula: OD₆₃₀ ≤ 0,065; biofilm negatif, 0,065 < OD₆₃₀ ≤ 0,130; biofilm positif lemah, dan OD₆₃₀ > 0,130; biofilm positif kuat (modifikasi Zheng *et al.*, 2017; Rahimi *et al.*, 2018).

Analisis Data

Hasil uji fenotipik pembentukan biofilm *E. faecalis* dilaporkan sebagai angka (persentase) dan dikorelasikan hubungannya dengan keberadaan gen *gelE* menggunakan uji *chi-square*. Nilai *P* < 0,05 dianggap signifikan secara statistik. Data dianalisis menggunakan perangkat lunak statistik SPSS (versi 23; SPSS, Chicago, IL, Amerika Serikat) (Zheng *et al.*, 2017).



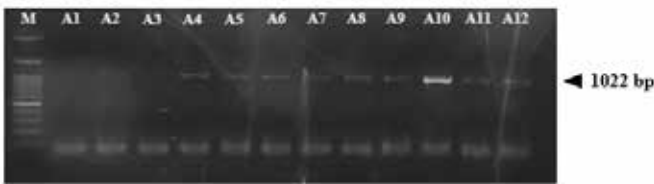
Gambar 1 Hasil isolasi bakteri *E. faecalis* dalam media agar selektif diferensial KF *Streptococcus*.

HASIL

Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri menggunakan media agar selektif diferensial KF *Streptococcus* adalah sebanyak 40 dari 60 sampel usap kloaka positif tumbuh adanya koloni bakteri. Bakteri *E. faecalis* ditunjukkan dengan koloni berbentuk bulat dengan ukuran < 1 mm, berwarna merah, dan mengubah warna media yang semula keunguan menjadi kekuningan setelah diinkubasi selama inkubasi selama 48 jam (Gambar 1). Akan tetapi, terdapat juga koloni yang tumbuh berwarna merah muda, berbentuk bulat dengan ukuran < 1 mm, dan juga mengubah warna media yang semula keunguan menjadi kekuningan. Koloni tersebut juga diteruskan dalam uji konfirmasi molekuler menggunakan gen spesifik bakteri *E. faecalis*.

Konfirmasi Molekuler Isolat Bakteri Menggunakan Gen Spesifik *E. faecalis*



Gambar 2 Representasi hasil PCR menggunakan gen spesifik *Efac* pada isolat *E. faecalis* asal ayam. A1: kontrol negatif. A2 : kontrol Positif. A3 : Hasil amplifikasi PCR sampel negatif. A4 – A12: Hasil amplifikasi PCR sampel positif.

Deteksi Gen Virulen *gelE*

Isolat yang terkonfirmasi sebagai *E. faecalis* melalui pengujian secara molekuler dilanjutkan dengan deteksi gen *gelE* dengan panjang amplicon sebesar 213 bp. Hasil deteksi menunjukkan bahwa sebanyak 21 dari 21 isolat (100%) menunjukkan hasil positif memiliki gen *gelE* yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Representasi hasil PCR deteksi gen virulen *gelE* pada isolat *E. faecalis* asal ayam.

Karakteristik Fenotipik Biofilm dan Korelasinya dengan Keberadaan Gen *gelE*

Hasil uji fenotipik biofilm pada isolat *E. faecalis* dengan *gelE* positif diperoleh bahwa sebanyak 0 dari 21 isolat (0%) tidak membentuk biofilm (biofilm negatif), 1 dari 21 isolat (4,76%) membentuk biofilm dengan intensitas positif lemah, dan 20 dari 21 isolat (95,23%) membentuk biofilm dengan intensitas positif kuat. Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan uji *chi-square* diperoleh adanya korelasi ($P < 0,05$) antara keberadaan gen virulen *gelE* dengan pembentukan biofilm pada isolat *E. faecalis* yang diisolasi dari kloaka ayam. Adapun karakteristik fenotipik biofilm yang dominan ditemukan adalah *E. faecalis* dengan pembentukan biofilm yang positif kuat.

PEMBAHASAN

Studi mengenai korelasi antara faktor virulen *gelE* dan pembentukan biofilm dengan menggunakan isolat *Enterococcus faecalis* asal ayam sejauh ini belum banyak dieksplorasi. Pengamatan *E. faecalis* dalam penelitian dikarenakan bakteri tersebut memiliki keistimewaan tersendiri mulai dari sisi fisiologis bakteri, tingkat tropisme, dan kemampuan bakteri dalam membentuk biofilm. *E. faecalis* sebagai bakteri oportunistik yang memiliki sisi fisiologis di antaranya mampu bertahan pada lingkungan ekstrem yaitu pada pH 4,5–10 dan suhu 5–65°C (Fisher & Phillips, 2009).

E. faecalis juga memiliki *host specificity* yang luas di antaranya dari kelas pisces, aves, dan mamalia. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan adanya streptococcosis karena infeksi *E. faecalis* pada ikan nila (Rizkiantino et al., 2021), pada kelas aves yaitu pada ayam dan burung (Rehman et al., 2018; Stępień-pyśnia et al., 2019), dan pada kelas mamalia yaitu manusia, anjing, dan kucing (Gulhan et al., 2015). Selain itu, *E. faecalis* mampu membentuk biofilmnya sendiri, hal inilah yang menjadi alasan *E. faecalis* penting untuk diteliti. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa biofilm yang terbentuk mampu berkontribusi terhadap resistensi antibiotik (Hashem et al., 2017).

Hasil dalam penelitian ini menunjukkan sebanyak 21 (52,50%) isolat asal kloaka ayam dinyatakan positif *E. faecalis* melalui uji PCR dengan primer spesifik. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan adanya *E. faecalis* pada isolat kloaka ayam sebanyak 24 (80%) isolat (Pillay et al., 2018). Isolat yang dinyatakan negatif didapatkan sebanyak 19 (47,50%) isolat pada pengujian PCR dikarenakan koloni yang dimaksud diduga mengarah kepada anggota genus *Enterococcus* lain, seperti *E. faecium*. Menurut Dai et al. (2018), bakteri *E. faecium* mencirikan koloni berbentuk bulat dan

berwarna merah muda. Menurut Fertner *et al.* (2011); Olsen *et al.* (2012), *E. faecalis* mampu menginfeksi mukosa kloaka ayam selama proses penetasan. Selain itu, kolonisasi *E. faecalis* dapat terjadi pada anak ayam yang baru menetas melalui transmisi vertikal dan horizontal termasuk sumber lingkungan. Transmisi vertikal dapat terjadi melalui ayam yang terinfeksi secara subklinis, sedangkan perpindahan bakteri secara horizontal dapat terjadi melalui kontak antar ayam, kontak dengan kulit telur yang terkontaminasi serta transmisi bakteri melalui udara pada bulu saat penetasan.

Hasil uji PCR dengan gen virulen *gelE* didapatkan bahwa 100% isolat membawa faktor virulen *gelE*. Gen *gelE* merupakan salah satu faktor virulen yang penting pada *E. faecalis*. Adapun distribusi gen *gelE* yang ditemukan pada isolat *E. faecalis* asal manusia yang pernah dilaporkan adalah sebesar 81,9% (Rahimi *et al.*, 2018). Selain pada isolat klinis manusia, gen virulen *gelE* juga terdapat pada hewan ternak seperti sapi sebesar 71,4% (Tawab *et al.*, 2016). Gen *gelE* bertanggung jawab untuk produksi gelatinase yang dapat menghidrolisis fibrinogen, insulin, kasein, kolagen, gelatin, dan hemoglobulin (Thurlow *et al.* 2010; Madsen *et al.* 2017). Menurut Lindenstrau *et al.* (2011), *E. faecalis* mampu menghasilkan protease berupa seng metaloprotease ekstraseluler yang dapat menghidrolisis gelatin, kolagen, dan kasein pada tubuh inangnya.

Isolat positif *gelE* memiliki fenotipik pembentukan biofilm kuat ($OD_{630} > 0,130$) sebanyak 20 (95,23%) isolat dan lemah ($0,065 < OD_{630} \leq 0,130$) sebanyak 1 (4,76%) isolat. Hal ini menunjukkan bahwa hampir semua isolat dikategorikan memiliki fenotipik biofilm yang kuat. Terdapat salah satu kondisi yang menjadi faktor adanya pembentukan biofilm yaitu ketersediaan sumber nutrisi bagi bakteri dengan penambahan glukosa 0,25% dalam media TSB pada pengujian fenotipik biofilm yang dapat mempengaruhi pembentukan biofilm pada *E. faecalis*. Hal ini telah ditunjukkan pada penelitian Kristich *et al.* (2004) dan Stępień-pyśniak *et al.* (2019) bahwa pembentukan biofilm pada *E. faecalis* dapat dipengaruhi salah satunya oleh konsentrasi glukosa dan ketika semakin kecil konsentrasi glukosa maka intensitas biofilm akan semakin kuat. Selain itu, protease dari *gelE* juga bertanggung jawab atas aktivitas promosi biofilm.

Terkait bagaimana transfer gen *gelE* antar spesies pada *E. faecalis* masih belum dapat diketahui. Menurut Gyles & Boerlin (2014), beberapa gen tertentu yang dapat ditransfer secara horizontal di antaranya gen yang terlibat dalam virulensi bakteri, terutama yang mengkode toksin, gen yang memiliki

mekanisme adhesi bakteri pada sel inang, dan sistem untuk memanipulasi transduksi sinyal inang atau mengekstraksi zat besi dari lingkungan inang yang rendah zat besi.

Ayam sebagai salah satu sumber protein hewani dan dekat dengan lingkungan manusia mungkin dapat membawa bakteri *E. faecalis* yang memiliki faktor virulen *gelE* yang dapat memengaruhi tubuh manusia atau bakteri *E. faecalis* yang juga berada pada usus manusia. Hal ini kiranya dapat menjadi bahan kajian terhadap kedekatan filogenetik antara gen *gelE* pada isolat *E. faecalis* asal ayam yang dibandingkan dengan isolat *E. faecalis* asal manusia pada studi-studi selanjutnya.

Korelasi antara faktor virulen *gelE* dan biofilm dilakukan dengan melakukan analisis statistika menggunakan uji *chi-square test*. Hasil uji menunjukkan adanya korelasi atau hubungan positif antara keberadaan gen *gelE* dengan kemampuan pembentukan biofilm pada isolat *E. faecalis* asal ayam. Hal ini menunjukkan bahwa gen *gelE* dapat memengaruhi pembentukan biofilm pada isolat *E. faecalis* asal ayam dengan intensitas pembentukan positif yang lemah hingga kuat. Hal ini selaras dengan temuan Rahimi *et al.* (2018) yang melaporkan bahwa pembentukan biofilm asal isolat klinis *E. faecalis* dengan infeksi saluran urinaria menunjukkan persentase hasil formasi biofilm yang kuat sebanyak 54,2% dari jumlah isolat *E. faecalis* yang ditemukan dalam studi, jika dibandingkan dengan spesies *Enterococcus* lain, seperti *E. faecium* sebanyak 17,6%. Menurut Bjarnsholt *et al.* (2013), biofilm bertindak sebagai konsorsium mikroba yang melekat pada permukaan biotik atau abiotik dan memiliki beberapa tahap seperti perlekatan ireversibel yaitu produksi matriks polimer ekstraseluler termasuk protein, polisakarida, dan asam nukleat. Pembentukan biofilm merupakan masalah penting yang menyebabkan kegagalan dalam pengobatan antimikroba karena sel-sel dalam biofilm sangat resisten terhadap antibiotik (Römling & Balsalobre, 2012). Sehingga diharapkan dengan adanya studi eksploratif ini dapat menjadi bahan kajian lanjutan dalam melihat hubungan kekerabatan *E. faecalis* pada berbagai inang dengan pendekatan faktor virulen yang dimiliki oleh bakteri tersebut.

Gen virulen *gelE* telah ditemukan pada 21 isolat *E. faecalis* dan 95,23% mampu membentuk biofilm dengan intensitas positif kuat. Berdasarkan analisis secara statistik menggunakan uji *chi-square*, faktor virulen *gelE* berkorelasi positif dengan pembentukan biofilm yang lemah hingga kuat pada bakteri *E. faecalis* asal ayam.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Rammahi SAK, Hussein JM, Kadhem EJ, Al-Hadad ASI. 2020. Bacteriological study of enterococcus bacteria isolated from different diseases in the female cows. *Biomed Pharmacol Journal* 13(2): 989–998.
- Bjarnsholt T, Alhede Maria, Alhede Morten, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, Jensen PØ, Høiby N. 2013. The in vivo biofilm. *Trends Microbiology* 21(9): 466–474.
- Dai F, Xiang X, Duan G, Duan B, Xiao X, Chang H. 2018. Pathogenicity characteristics of *Enterococcus faecium* from diseased black bears. *Iran Journal of Veterinary Research* 19(2): 82–86.
- Fertner ME, Olsen RH, Bisgaard M, Christensen H. 2011. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53(1): 56.
- Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155(6): 1749–1757.
- Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology* 151(2): 125–140.
- Gulhan T, Boynukara, Ciftci, Sogut, Findik A. 2015. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Irian Journal of Veterinary Research* 16(3): 261–266.
- Gyles C dan Boerlin P. 2014. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Veterinary Pathology* 51(2): 328–340.
- Hashem YA, Amin HM, Essam TM, Yassin AS, Aziz RK. 2017. Biofilm formation in enterococci: Genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific Reports* 7(1): 1–12.
- Kiruthiga A, Padmavathy K, Shabana P, Naveenkumar V, Gnanadesikan S, Malaiyan J. 2020. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of Enterococci. *BMC Research Notes* 13(170): 1–7.
- Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. 2004. *Esp*-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 186(1): 154–163.
- Lindenstrauß AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF. 2011. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 553–560.
- Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M. 2017. Virulence factors associated with *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: a mini review. *Open Microbiology Journal* 11: 1–11.
- Olsen RH, Christensen H, Bisgaard M. 2012. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* during hatch of broiler chicks. *Veterinary of Microbiology* 160: 214–221.
- O’Driscoll T and Crank CW. 2015. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance* 8: 217–230.
- Pillay S, Zishiri OT, Adeleke MA, Zishiri O. 2018. Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 85(1): 1–8.
- Rahimi N, Poursina F, Sadat Ghaziasgar F, Sepehrpor S, Hassanzadeh A. 2018. Presence of virulence factor genes (*gelE* and *esp*) and biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from urinary tract infection in Isfahan, Iran. *Gene Reports* 13: 72–75.
- Rahman M, Rahman MM, Deb SC, Alam MS, Alam MJ, Islam MT. 2017. Molecular identification of multiple antibiotic resistant fish pathogenic *Enterococcus faecalis* and their control by medicinal herbs. *Scientific Reports* 7(1): 1–12.
- Rehman MA, Yin X, Zaheer R, Goji N, Amoako KK, McAllister T, Pritchard J, Topp E, Diarra MS. 2018. Genotypes and phenotypes of Enterococci Isolated From Broiler Chickens. *Front in Sustainable Food Systems* 2: 1–83.
- Römling U, Balsalobre C. 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* 272(6): 541–561.
- Rizkiantino R, Wibawan IWT, Pasaribu FH, Soejoedono RD, Arnafia W, Ulyama V, Wibowo DB. 2020. Isolation and characterization of the *Enterococcus faecalis* strain isolated from red tilapia (*Oreochromis hybrid*) in Indonesia: A preliminary report. *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 7(1): 27–42.
- Rizkiantino R, Pasaribu FH, Soejoedono RD, Purnama S, Wibowo DB, Wibawan IWT. 2021. Experimental infection of *Enterococcus faecalis* in red tilapia (*Oreochromis hybrid*) revealed low pathogenicity to cause streptococcosis. *Open Veterinary Journal* 11(2): 309–318.
- Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, D’Azevedo PA. 2014. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 5(5): 634–637.

- Stępień-pyśniak D, Hauschild T, Kosikowska U, Dec M, Urban-chmiel R. 2019. Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. *Scientific Reports* 9: 1–7.
- Tawab AE, Ammar AM, Marwa I, Hamid AE, Dessouky ENE. 2016. Virulence genotyping of *Enterococcus* species isolated from meat and milk products. *Benha Veterinary Medical Journal* 31(2): 158–164.
- Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. 2010. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect and Immun* 78(11): 4936–4943.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10): 4473–4479.
- Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. 2003. Role of the *Enterococcus faecalis* Ge1E protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *Journal of Bacteriology* 185(12): 3613–3623.
- Wellinghausen N, Charterjee I, Berger A, Niederfuehr A, Proctor RA, Kahl BC. 2020. Characterization of clinical *Enterococcus faecalis* small-colony variants. *Journal of Clinical Microbiology* 47(9): 2802–2811.
- Zheng JX, Bai B, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng X Bin, Deng QW, Yu ZJ. 2018. Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *Journal of Medical Microbiology* 67: 60–67.
- Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng QW, Qu D, Yu ZJ. 2017. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Frontiers in Microbiology* 8: 1–9.