

## MINI REVIEW

### METODE DAN APLIKASI *HIGH THROUGHPUT SCREENING* PADA EKSPLORASI SENYAWA BIOPROSPEKTIF BIOTA LAUT SPONS DAN KARANG LUNAK

Hedi Indra Januar<sup>1,2,)</sup>, Dafit Ariyanto<sup>1,3)</sup>, Mohammad Muhaemin<sup>1,4)</sup>, Rr. Puji Hastuti Kusumawati<sup>1,5)</sup>, dan Sugeng Putranto<sup>1,6)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Rasamala, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

<sup>2)</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jl. KS Tubun Petamburan VI Slipi Jakarta Pusat 10260.

<sup>3)</sup>Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Asahan, Jl. A Yani Kisaran, Sumatera Utara 21224.

<sup>4)</sup>Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. S. Brojonegoro No 1, Bandar Lampung 35145.

<sup>5)</sup>Fakultas Politeknik Negeri Pontianak, Jl. A Yani, Pontianak 78124

<sup>6)</sup>PT. Donggi-Senoro LNG, Sentra Senayan II Lantai 8, Jl. Asia Afrika Senayan Jakarta 10270.

E-mail: idjanuar@kkp.go.id

#### ABSTRACT

The marine sessile organisms, i.e. sponge and soft coral, are resources which potential to produce new bioprospecting chemicals. Within the exploration strategy trough these species, an application of high throughput screening (HTS), is one of the most important step to direct the research for gaining new chemicals with pharmacological prospective. The phylosophy of HTS methods is scaling the analysis start from the sample which has the most probable to contain new compounds and efficiency of sample used as the raw material from marine resources considerably smaller than terrestrial resources. This mini review presents the HTS technique for marine organims, expecially for sponge and soft coral, which includes dereplication, NMR 'phytochemistry', HPLC, and spectroscopic and bioassay techniques. Application of these techniques to sponges and soft corals collected from Seribu Islands waters gained 18 known bioactive chemicals and 1 new compound from soft coral *Nephthea* sp.

**Keywords:** Bioprospecting, High Troughput Screening, antitumor, antibacterial, sponge, soft coral.

#### PENDAHULUAN

Sebagai wilayah yang memiliki terumbu karang tropis yang luas, Indonesia merupakan area yang mempunyai potensi kelautan tinggi dalam eksplorasi untuk menemukan senyawa bahan alam baru yang memiliki bioaktivitas farmakologis. Leal et al. (2012) menerangkan bahwa selama selang waktu dua dekade, penemuan senyawa baru dari areal geografis Indonesia adalah nomor lima di bawah Jepang, Taiwan, China, dan Korea Selatan, dengan peningkatan sebesar 300% dari era 1990an hingga 2000an. Penelusuran senyawa baru ini mempunyai nilai bioprospeksi tinggi, terutama untuk menemukan konfigurasi senyawa antitumor baru untuk keperluan

farmaseutikal (Harvey 2008). Ditinjau dari sisi luasan wilayah terumbu karangnya dan juga sarana yang dimiliki oleh institusi riset dan perguruan tinggi Indonesia saat ini, dapat diperkirakan bahwa di masa mendatang persentase penemuan senyawa baru dari biota laut Indonesia akan semakin tinggi.

Sebagai tahapan awal dalam strategi penelitian untuk mendapatkan senyawa baru, pemilihan biota target penelitian menjadi hal yang sangat penting. Filum Porifera (spons) dan karang lunak dapat menjadi target yang tepat, oleh karena kedua jenis biota laut ini memiliki diversitas senyawa bioaktif tinggi (Faulkner 2001; Bhakuni & Rawat 2005; Pawlink 1993).

Keterbaruan ini, bisa dari sisi informasi rantai struktur, gugus fungsi, dan juga rotasi atom kiral dari suatu senyawa yang ditemukan.

Selain pemilihan dari jenis sampel, penapisan sampel dalam jumlah yang besar dari suatu hasil eksplorasi lapangan hingga ke indentifikasi senyawa bioaktifnya harus diarahkan agar secara cepat sehingga dapat menapis biota-biota yang potensial memiliki senyawa baru. Li & Vederas (2009) menerangkan bahwa teknik pengarahannya ini disebut dengan *High Throughput Screening* (HTS). Aplikasi dari HTS akan mengoptimalkan bahan baku spons dan karang lunak, karena relatif jumlahnya lebih terbatas jika dibandingkan dengan bahan baku untuk eksplorasi dari biota darat.

Hal inilah yang mendasari penulisan makalah ini. Berdasarkan telaah kepustakaan, makalah ini akan menjelaskan teknik HTS yang dapat diterapkan pada suatu penelitian yang memiliki target menemukan senyawa baru dari biota spons dan karang lunak. Penelaahan akan dimulai dari karakteristik senyawa-senyawa yang berasal dari spons dan karang lunak, kemudian dilanjutkan dengan secara umum teknik HTS untuk isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif dari kedua jenis biota ini yang berbeda dengan penelusuran senyawa aktif biota darat umumnya. Selanjutnya, akan dipaparkan aplikasi dari teknik HTS ini untuk mengidentifikasi beberapa senyawa bioaktif baru dari spons dan karang lunak asal Kepulauan Seribu.

#### **KARAKTERISTIK SENYAWA BIOAKTIF DARI SPONS DAN KARANG LUNAK**

Walaupun merupakan dua biota yang memiliki diversitas senyawa bioaktif tertinggi dari biota laut, namun karakteristik senyawa bioaktif dari kedua biota ini memiliki perbedaan yang mendasar. Senyawa aktif karang lunak dihasilkan karang lunak itu sendiri (Michalek-Wagner et al. 2000). Sementara, penelitian mengenai mikroorganisme simbiosis dari spons, seperti bakteri dan fungi, telah menemukan bahwa biota simbiosis inilah yang menghasilkan senyawa bioaktif (Uria & Piel 2009).

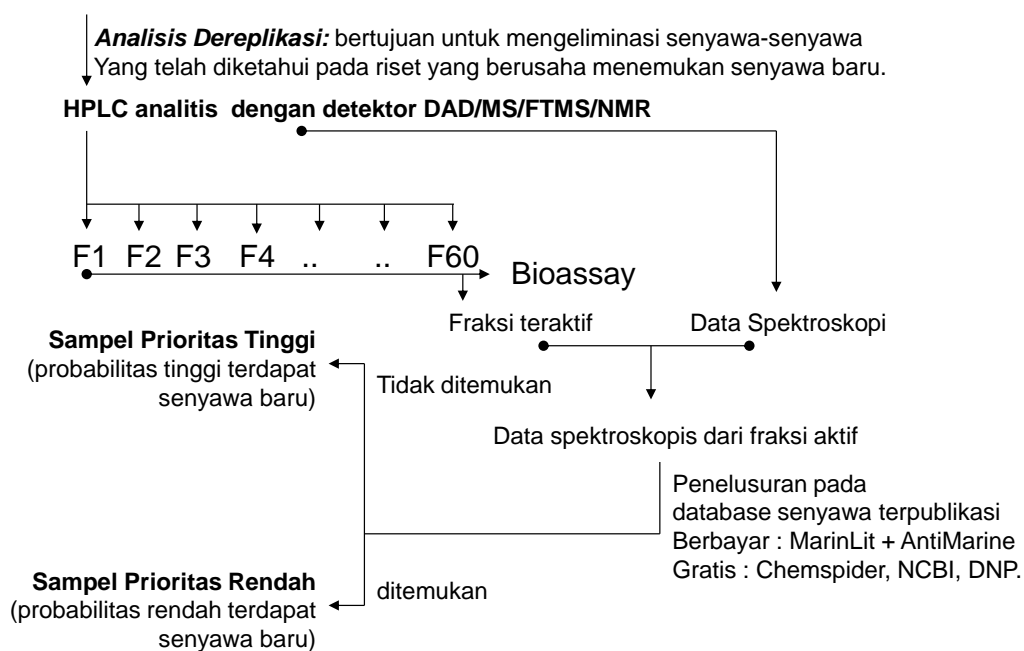
Oleh karena senyawa bioaktif yang terdapat pada spons sangat dipengaruhi oleh mikroba simbiosisnya, maka variasi dari senyawa bioaktif spons sangat tinggi (Pawlink 1993). Ekstrak dari spons dapat mengandung senyawa bioaktif jenis alkaloid, flavonoid, fenolik, terpenoid, steroid, dan lainnya (Bhakuni & Rawat 2005). Variasi juga terlihat dalam ukuran berat molekul maupun tingkat polaritasnya (Faulkner 2001). Hal inilah yang menyebabkan spons dan juga simbiosisnya kerap menjadi target utama dalam eksplorasi untuk menemukan senyawa baru, baik pada tingkatan konfigurasi struktur, variasi gugus fungsi, maupun rotasi atom kiral yang baru.

Sementara pada karang lunak, tingkat variasi konfigurasi struktur relatif lebih sedikit. Walaupun telah dilaporkan bahwa ekstraknya dapat mengandung berbagai senyawaan metabolit sekunder, yaitu terpenoid, steroid, eicosanoid, alkaloid, dan lain-lainnya, namun golongan utama senyawa bioaktif dari biota ini adalah kelas terpenoid (Rocha et al. 2011; Sammarcol & Col 1992; Lages et al. 2006). Secara mayoritas senyawa bioaktif (antitumor) terpenoid dari karang lunak merupakan kelas diterpenoid – cembranoid yang berciri utama memiliki cincin utama 20 atom karbon (Januar et al. 2012; Januar et al. 2010). Oleh karena itu, secara umum, eksplorasi senyawa bioaktif dari karang lunak memiliki potensi menemukan konfigurasi rangka baru yang lebih rendah. Senyawa baru umumnya akan ditemukan dari perbedaan gugus fungsi pada cincin utama dan juga rotasi atom kiral yang terdapat didalamnya. Kepolaran dari senyawa ini umumnya terletak di area semipolar dan berbobot molekul antara 200-600 dalton.

#### **TAHAP AWAL EKSPLORASI: PENAPISAN DEREPLIKASI DAN "FITOKIMIA" NMR**

Pada tahapan dari eksplorasi HTS, sampel-sampel diurutkan berdasarkan skala prioritasnya, tentang kemungkinannya mendapatkan senyawa jenis baru atau tidak. Diagram dari tahapan awal ini seperti yang terlihat dalam Gambar 1.

## Ekstrak kasar / fraksi awal

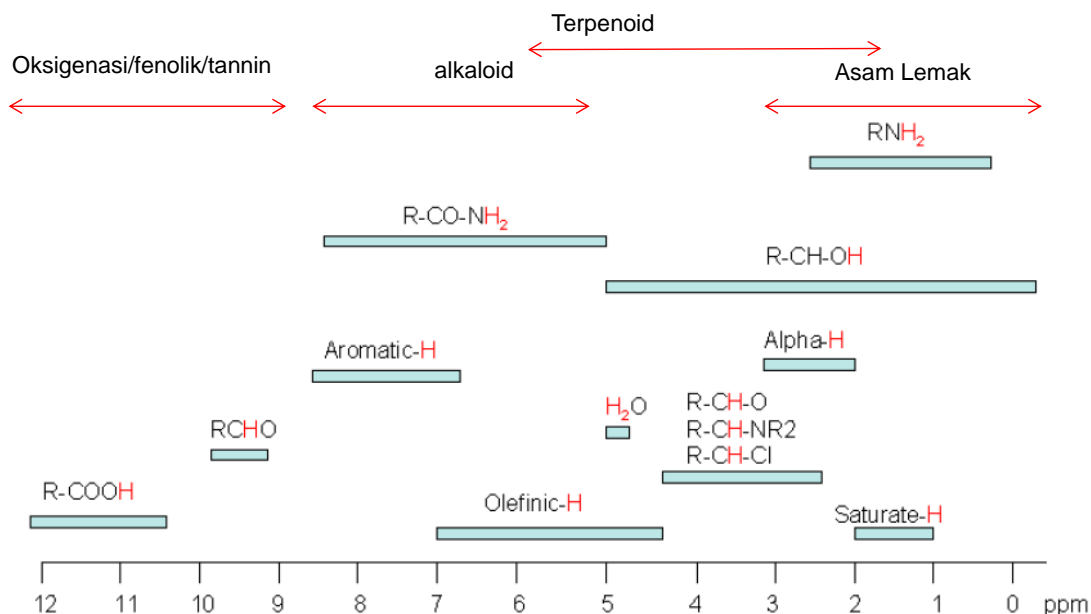


**Gambar 1.** Diagram alir tahapan awal eksplorasi HTS

Pembuatan urutan prioritas sampel-sampel yang berpotensi memiliki senyawa baru ini dinamakan teknik dereplikasi (Januar et al. 2007). Teknik ini, seperti yang terlihat dalam diagram pada Gambar 1, dilakukan dengan mencuplik sedikit sampel, lalu difraksinasi dengan menggunakan kolom analitis/semi-preparatif HPLC, dan selanjutnya data spektroskopis fitokimia NMR dan massa dari fraksi yang menunjukkan bioaktivitas tinggi dikomparasi pada database senyawa yang telah ada (Januar et al. 2009). Hal yang sangat penting adalah keterbaruan dari database yang dipergunakan. Database lama dapat membuat kesalahan interpretasi, senyawa yang telah terpublikasi belum masuk dalam database tersebut (Corley and Durley 1994).

Data spektroskopi yang dimasukkan sebagai parameter pencarian dalam dereplikasi umumnya meliputi data bioaktivitas secara kualitatif (sitotoksik, antibakteri, antioksidan, dan lainnya), serta parameter massa dan juga geser kimia dari gugus fungsi fraksi aktif di spectrometer NMR. Selain berguna untuk pengenalan

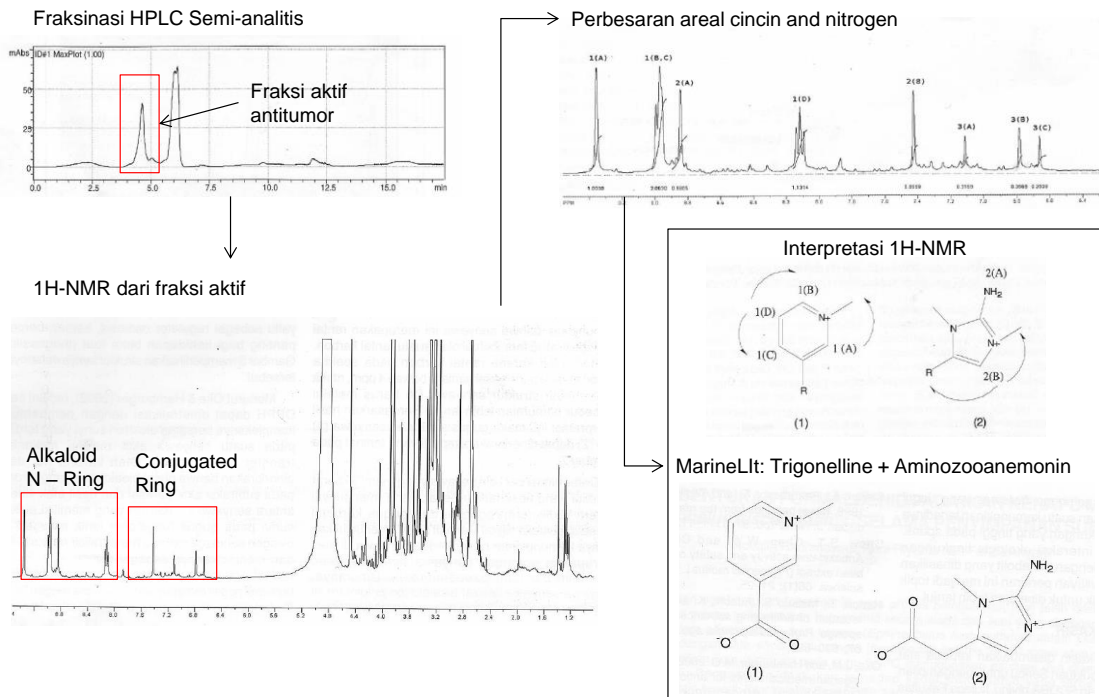
cara cepat pada dereplikasi, golongan senyawa-senyawa aktif yang tidak terdapat pada database, dapat ditentukan melalui geser kimia pada grafik  $^1\text{H-NMR}$ , seperti pengujian fitokimia. Hasil dari "Fitokimia" NMR ini selaras dengan fitokimia klasik. Perbedaan utama adalah sampel yang diuji di spectrometer NMR dapat dipergunakan kembali/tidak merusak, berbeda dengan fitokimia klasik yang mereaksikan bahan ekstrak sehingga tidak dapat dipakai untuk pengujian lainnya. Oleh karena itu, teknik ini tepat pada eksplorasi biota laut yang secara umum memiliki bahan baku terbatas. Selain itu, teknik ini akurat dalam pengenalan suatu golongan senyawa. Contohnya antara asam amino dan alkaloid. Pada fitokimia klasik, kedua jenis ini dapat kesalahan interpretasi, sementara pada spectra NMR, hal ini tidak akan terjadi. Olah ulang dari gugusan chemical shift dari Edwards (2008) menunjukkan secara umum kelompok senyawa yang umum dianalisis pada fitokimia, seperti yang terlihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Gugus senyawa kimia pada spektroskopi  $^1\text{H-NMR}$  (Modified from Edwards 2008)

Aplikasi teknik dereplikasi dan "fitokimia" NMR dalam identifikasi cepat suatu senyawa bioaktif misalnya yang dilakukan oleh Januar et al. (2007) dalam pengenalan senyawa regulator osmosis, yang memiliki sifat antitumor yaitu trigoneline dan aminozooanemonin, dari spons *Petrosia* sp. dari Kepulauan Pari (Gambar 3). Teknik yang dilakukannya ini berbasis kepada data spektroskopi  $^1\text{H-NMR}$ . Pada tahapan awal dilakukan fraksinasi pada kromatografi kinerja tinggi di skala semi-preparatif (10 mg/mL sebanyak 5 mL).

Tiap fraksi ditampung dalam vial pada selang tiap 30 detik. Selanjutnya, keseluruhan fraksi di uji aktivitasnya, sehingga didapatkan satu puncak aktif. Hasil uji "fitokimia" NMR menemukan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi aktif adalah senyawa yang memiliki gugus cincin terkonjugasi, dan juga memiliki atom nitrogen dalam cincin, sehingga termasuk pada golongan senyawa alkaloid. Penelusuran pada database MarinLit menemukan bahwa kedua senyawa adalah trigoneline dan aminozooanemonin.



**Gambar 3.** Teknik dereplikasi dan fitokimia  $^1\text{H-NMR}$  pada pengenalan cara cepat dari senyawa bioaktif yang telah ditemukan (Januar et al. 2007)

### ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF

Setelah diperoleh susunan prioritas sampel yang memiliki potensi tinggi mengandung senyawa aktif baru, proses isolasi dan identifikasi dilakukan dengan panduan bioassay atau yang sering disebut dengan *bioassay guided fractionation* (López-Pérez et al. 2007). Secara umum, ekstrak etanol/methanol dari biota laut, seperti spons dan karang lunak, memiliki kadar garam yang cukup tinggi. Oleh karena itu, tahapan awal dari isolasi harus dilakukan dengan eliminasi kandungan anorganik ini terlebih dahulu. Cara melakukan hal ini adalah dengan melewati ekstrak pada kolom SPE flash chromatography  $\text{C}_{18}$ , dengan fasa gerak methanol dan diklorometana (Noyer et al. 2011). Setelah itu, ekstrak bebas garam ini baru difraksinasi dan isolasi secara berurutan pada kolom HPLC preparatif (skala sampel 2-150 g), semipreparatif (0,1-2 g), dan analitis (100-200 mg), hingga didapatkan isolat senyawa bioaktif dari target.

Setelah senyawa terisolasi, yang dibuktikan dengan keselarasan integrasi pada grafik geser kimia  $^1\text{H-NMR}$ , proses karakterisasi secara kimiawi dilakukan

sebelum karakterisasi secara biologis. Hal ini disebabkan elusidasi struktur kimiawi dengan NMR, isolat harus terdapat jumlah yang cukup tinggi, berkisar antara 5-10 mg. Setelah karakterisasi kimiawi dilakukan, sampel dapat dipergunakan lebih lanjut pada karakterisasi biologis, seperti tingkat selektivitas sitotoksik isolat pada beberapa sel tumor, mekanisme kerjanya, dan lainnya. Data utama yang dibutuhkan pada elusidasi kimiawi meliputi data geser kimia proton, karbon, korelasi antara karbon-proton, serta rotasi aktif dari tiap atom kiral untuk mengetahui pola stukturinya secara dua dan tiga dimensi (Januar et al. 2010).

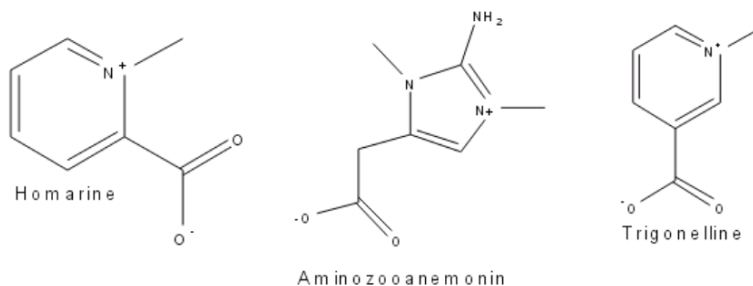
### APLIKASI HTS PADA ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF DARI SPONS DAN KARANG LUNAK

Aplikasi dari teknik HTS ini dengan cepat dapat mengidentifikasi senyawa yang telah terpublikasi dan juga beberapa senyawa baru. Aplikasi ini, pada penapisan yang dilakukan terhadap beberapa jenis sampel spons dan karang lunak asal Kepulauan Seribu mendapatkan senyawa-senyawa menarik sebagai berikut.

#### Senyawa Osmo-regulator dari Spons *Petrosia* sp.

Penelitian dengan cara HTS yang dilakukan oleh (Januar et al. 2007) telah menemukan tiga senyawa osmo-regulator yang terdapat pada *Petrosia* sp. asal Perairan Pulau Pari, Kepulauan Seribu. Ketiga senyawa yang sudah diketahui pada golongan alkaloid betaines ini adalah homarine, aninozooanemonin, dan trigoneline (Gambar 4). Hal yang menarik yang dianalisis pada penelitian sedang berada pada kondisi tidak sehat (Januar et al. 2007).

secara ekologis adalah tingginya kosentrasi dari senyawa alkaloid betaines di dalam *Petrosia* sp. asal Kepulauan Pari. Sebagai senyawa osmo-regulator, keberadaan betaines merupakan upaya dari spons untuk menyeimbangkan kerusakan sel dengan peluruhan asam amino akibat stressor dari luar sel (Viant et al. 2003). Hal ini menjadi indikator secara ekologis bahwa biota

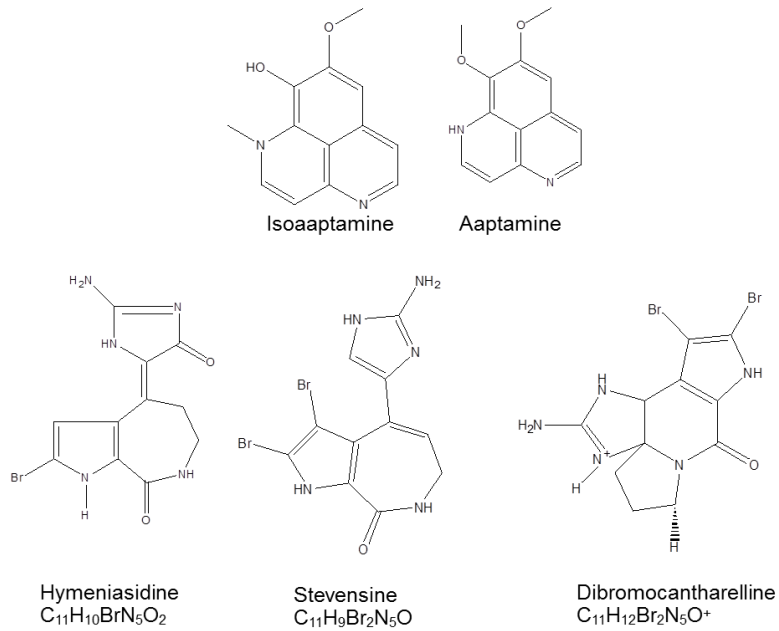


**Gambar 4.** Senyawa antitumor *Petrosia* sp. Kepulauan Pari (Januar et al. 2007)

#### Senyawa Sitotoksik *Aaptos* sp. dan *Stylissa* sp.

Pada tahapan dereplikatif, juga ditemukan bahwa Spons *Aaptos* sp. dan *Stylissa* sp. yang memiliki bioaktivitas tinggi sebagai antitumor dan antibakteri. Penelusuran data spektroskopisnya di database menemukan bahwa *Aaptos* sp. mengandung senyawa aktif alkaloid aaptamine dan iso-aaptamine sementara serta *Stylissa* sp. mengandung senyawa alkaloid terhalogenasi, yaitu hymeniasidine, stevensine, dan dibromocantharelline (Gambar 5). Secara ekologis hal yang menarik ditemukan adalah konsentrasi dari

senyawa sitotoksik *Aaptos* sp. sangat tinggi. Jika umumnya biota ini hanya mengandung sebesar 5% aaptamine dalam ekstraknya, maka *Aaptos* sp. yang diambil dari perairan Pulau Karya ini mengandung senyawa aktif tersebut sebesar 55% (Dewi et al. 2010). Tingginya kandungan pencemaran nitrogen dalam perairannya memiliki keterkaitan terhadap tingginya produksi dari senyawa ini oleh *Aaptos* sp (Dewi et al. 2010). Hal yang selaras juga ditemukan pada ekstrak dari *Stylissa* sp. yang ditemukan meningkat pada zona penduduk. Diperkirakan *run-off* bakteri terrestrial memicu tingginya produksi senyawa antibakteri pada biota ini (Marraskuranto et al. 2013).

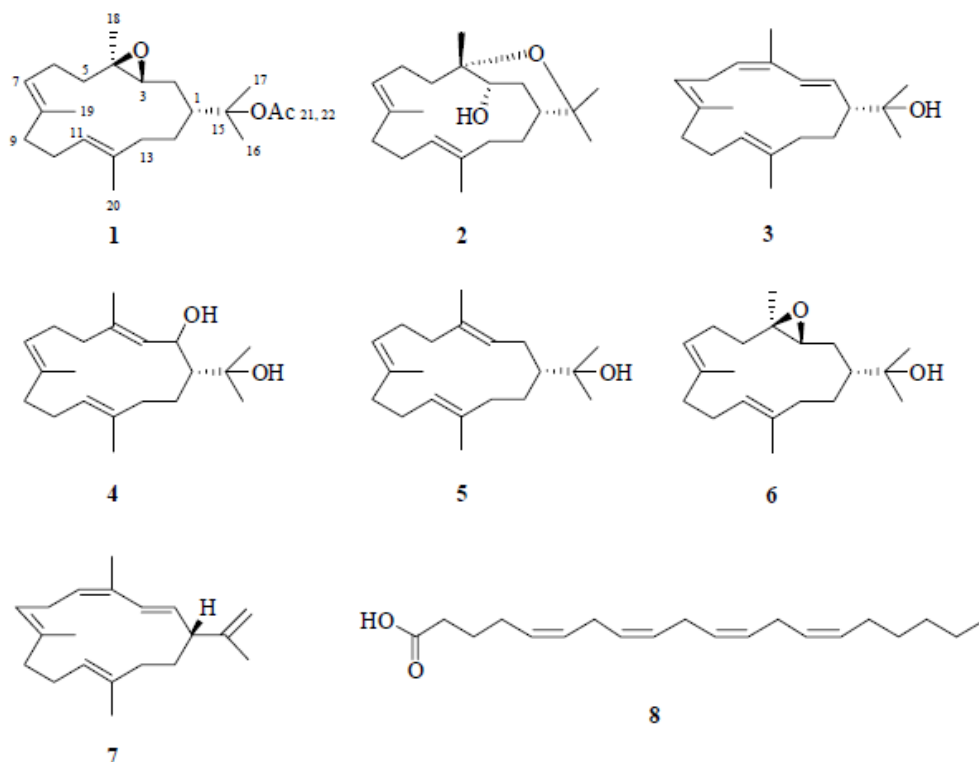


**Gambar 5.** Senyawa bioaktif antitumor dan antibakteri dari *Aptos* sp. dan *Stylissa* sp. (Januar et al. 2009; Dewi et al. 2010)

#### Senyawa Antitumor *Nephthea* sp. dan *Sarcophyton* sp.

Penelitian bioprospeksi terhadap biota karang lunak akan mendapatkan golongan senyawa diterpenoid-cembranoid. Pada dua jenis karang lunak, yaitu *Nephthea* sp. dan *Sarcophyton* sp. asal Kepulauan Seribu menggunakan teknik HTS telah ditemukan 10 jenis senyawa diterpenoid dan satu asam lemak. Pada analisis yang dilakukan oleh (Januar et al. 2010) terhadap *Nephthea* sp., teridentifikasi 8 jenis senyawa sitotoksik

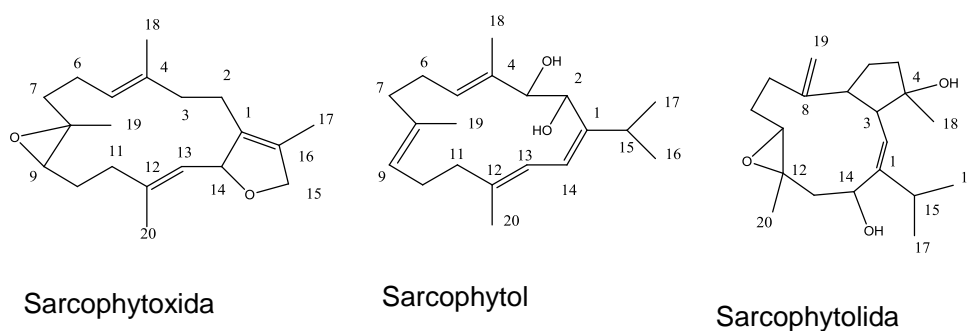
(Gambar 6) dengan 6 jenis senyawa cembranoid yang telah diketahui (2-7), satu jenis senyawa asam lemak yang telah diketahui (8), dan satu jenis senyawa cembranoid baru (1). Terdapat hal yang menarik pada wilayah perairan Kepulauan Seribu ini, senyawa 15-hidroksi cembranoid (3) ditemukan pada jumlah yang besar di wilayah tereutrofikasi tinggi, sementara senyawa baru 3,4 epoksi nephthenol asetat (1), hanya ditemukan di wilayah yang berkadar nutrient rendah (Januar et al. 2011).



**Gambar 6.** Senyawa bioaktif sitotoksik dari *Nephthea* sp. asal kepulauan Seribu (Januar et al. 2010)

Sementara penapisan yang dilakukan terhadap senyawa sitotoksik dari *Sarcophyton* sp. asal Kepulauan Seribu

menemukan senyawa cembranoid yang memiliki tingkat sitotoksitas tinggi (Gambar 7).



**Gambar 7.** Senyawa bioaktif sitotoksik dari *Sarcophyton* sp. asal kepulauan Seribu (Iswani et al. 2014)

## KESIMPULAN

Terumbu karang tropis Indonesia merupakan areal yang potensial untuk riset bioprospeksi yang bertujuan menemukan senyawa farmakologis baru. Namun berbeda dengan sumberdaya bahan alam dari wilayah terestrial, bahan baku untuk penelitian kimia bahan alam dari biota laut, seperti spons dan karang lunak, jauh lebih terbatas. Oleh karena itu, penggunaan

teknik *High Troughput Screening*, dengan implementasi peralatan kimiawi dan biologi yang baik, diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa baru dari spons dan karang lunak.

## DAFTAR PUSTAKA

Bhakuni, D.S., Rawat, D.S. 2005. *Bioactive Marine Natural Products*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.

- Corley, D.G., Durley, R.C. 1994. Strategies for database dereplication of natural products. *Journal of Natural Products* 57, 1484–1490.
- Dewi, A.S., Hadi, T.A., Januar, H.I. Pratitis, A., Chasanah, E. 2010. Study on The Effects of Pollutants on The Production of aaptamines and the cytotoxicity of crude extract from *Aaptos suberitoides*. *Squalen* 7, 97–104.
- Edwards, J.C., 2008. Principles of NMR. *Process NMR Associates LCC*, pp.1–27. Available at: <http://www.process-nmr.com/nmr1.thm>.
- Faulkner, D.J. 2001. Marine natural products. *Natural Product Reports* 18, 1–49.
- Harvey, A.L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(October), pp.894–901.
- Iswani, S., Tohir, D., Januar, H.I. 2014. Identification of Cytotoxic Compounds in Soft Coral Sarcophyton sp. from Panggang Island Water, Seribu Islands National Parks. *Journal of Indonesian Pharmacy*, p. In Press.
- Januar, H.I., Chasanah, E., Motti, C.A., Tapiolas, D.M., Liptrot, C.H., Wright, A.D. 2010. Cytotoxic Cembranes from Indonesian Specimens of the Soft coral *Nephthea* sp. *Marine Drugs* 8, 2142–2152.
- Januar, H.I., Hendrarto, B., Chasanah, E., Wright, A.D. 2011. *Nephthea* sp. : Correlation Between Natural Products Production and Pressure from Local Environmental Stressors. *Journal of Marine Science: Research & Development*, S8, 1–8.
- Januar, H.I., Marraskuranto, E., Patantis, G. & Chasanah, E. 2012. LC-MS metabolomic analysis of environmental stressor impacts on the metabolite diversity in *Nephthea* spp. *Chronicles of Young Scientists* 3, 57–62.
- Januar, H.I., Motti, C.A., Tapiolas, D.M., Wright, A.D. 2009. Dereplication analysis of identification of antibacterial compounds in *Axinella* sponges from Karimunjawa Islands waters. *Indonesian Journal of Marine and Fisheries Post-harvest and Biotechnology* 4, 79–86.
- Januar, H.I., Patmaesari, L., Wikanta, T., Chasanah, E. 2007. Dereplication analysis of bioactive substances in polar fraction of *Petrosia* sp. from Seribu Islands waters. *Indonesian Journal of Marine and Fisheries Post-harvest and Biotechnology* 2, 129–136.
- Lages, B.G., Fleury, B.G., Ferreira, C.E.L., Pereira, R.C. 2006. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 328, 127–135.
- Leal, M.C., Puga, J., Serôdio, J., Gomes, N.C.M., Calado, R. 2012. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades--where and what are we bioprospecting? *PloS One* 7, e30580. doi:10.1371/journal.pone.0030580
- Li, J.W.H., Vederas, J.C., 2009. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?. *Science* 325, 161–165.
- López-Pérez, J.L., Therón, R., del Olmo, E., Díaz, D. 2007. NAPROC-13: a database for the dereplication of natural product mixtures in bioassay-guided protocols. *Bioinformatics* 23, 3256–3257.
- Marraskuranto, E., Chasanah, E., Januar, H.I., Soesilowati, R., Fajarningsih, N.D., Patantis, G. 2013. Efek Stressor Antropogenik pada Senyawa Bioaktif dari Biota Terumbu Karang. Laporan Teknis Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan bioteknologi Kelautan dan Perikanan.
- Michalek-Wagner, K., Bowden, B.F., Effects, B.F. 2000. Effects of bleaching on secondary metabolite chemistry of alcyonacean soft corals. *Journal of Chemical Ecology* 26, 1543–1562.
- Noyer, C., Thomas, O.P., Becerro, M.A. 2011. Patterns of Chemical Diversity in the Mediterranean Sponge *Spongia lamella*. *PloS One* 6, p.e20844. DOI: 10.1371/journal.pone.0020844.
- Pawlink, J.R., 1993. Marine Invertebrate Chemical Defenses. *Chemical Reviews* 93, 1911–1922.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N.C.M., Calado, R. 2011. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds--an overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs* 9, 1860–86.
- Sammarcol, P.W., Col, J.C. 1992. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Marine Ecology Progress Series* 88, 93-104.

- Uria, A., Piel, J. 2009. Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. *Phytochemistry Reviews* 8, 401–414.
- Viant, M.R., Rosenblum, E.S., Tjeerdema, R.S. 2003. NMR-Based Metabolomics: A Powerful Approach for Characterizing the Effects of Environmental Stressors on Organism Health. *Environmental Science & Technology* 37, 4982–4989.