



PERUBAHAN KANDUNGAN TOTAL FLAVONOID DALAM SEDUHAN DAUN PULAI (*Alstonia scholaris* (L.) R.Br.) SEBELUM DAN SETELAH PENCERNAAN *IN VITRO* DENGAN VARIASI LAMA PENYEDUHAN

[Changes in Total Flavonoid Content in Infusions of Pulai Leaves (*Alstonia scholaris* (L.) R.Br.) Before and After *In Vitro* Digestion with Variations in Steeping Time]

Rumaisho^{1*}, Endang Prangdimurti¹, Nurheni Sri Palupi¹

¹Program Studi Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

*Email: rumaishopatono20@gmail.com (Telp: +6285279932434)

Diterima Tanggal 10 Agustus 2024

Disetujui Tanggal 16 Agustus 2024

ABSTRACT

This study aimed to examine the changes in total flavonoid content before and after *in vitro* digestion and to determine the optimal steeping time. The study was conducted using a completely randomized design (CRD) with steeping times of 5, 10, 15, 20, and 25 minutes, with two repetitions. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). If the analysis indicated significant effects, further analysis was conducted using the Duncan new multiple range test (DNMRT) at a 5% significance level to determine the effects between different treatments. The parameters observed were the total flavonoid content before and after *in vitro* digestion. Variations in steeping time, both before and after *in vitro* digestion, showed significant results at the 5% level. The total flavonoid content after *in vitro* digestion decreased by nearly 50%. Steeping for 20 minutes was found to be the optimal treatment, yielding the highest total flavonoid content both before *in vitro* digestion (10.34 mg QE/g) and after *in vitro* digestion (2.84 mg QE/g).

Keywords: Total flavonoids, pulai leaves, steeping time, before and after *in vitro* digestion

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melihat perubahan total flavonoid sebelum dan setelah pencernaan *in vitro* dan memperoleh waktu penyeduhan terbaik. Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan lama penyeduhan yang terdiri 5, 10, 15, 20, 25 menit dengan ulangan sebanyak 2 kali. Data dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh yang nyata, akan dilanjutkan dengan analisis menggunakan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5% untuk menentukan pengaruh antara perlakuan yang berbeda. Parameter yang diamati adalah nilai total flavonoid sebelum dan setelah *in vitro*. Variasi lama penyeduhan baik sebelum maupun setelah pencernaan *in vitro* menunjukkan hasil yang signifikan pada taraf 5%. Perubahan nilai total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* mengalami penurunan hampir 50%. Penyeduhan dengan 20 menit merupakan perlakuan terbaik dengan memiliki nilai total flavonoid tertinggi baik sebelum pencernaan *in vitro* (10,34 mg QE/g) maupun setelah pencernaan *in vitro* (2,84 mg QE/g).

Kata kunci: Total flavonoid, daun pulai, lama penyeduhan, sebelum dan setelah pencernaan *in vitro*

PENDAHULUAN

Flavonoid merupakan senyawa alami yang banyak ditemukan pada berbagai tanaman, termasuk daun pulai (Syarifuddin *et al.* 2021). Senyawa ini dikenal memiliki aktivitas farmakologis yang sangat tinggi. Flavonoid memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antioksidan, antitumor, perlindungan terhadap penyakit jantung dan pembuluh darah,



serta sifat antiinflamasi (Adaramoye 2012). Flavonoid dapat dibagi menjadi beberapa kelompok yang berbeda berdasarkan tingkat oksidasi pada cincin C, tingkat ketidakjenuhan, serta jumlah dan posisi gugus -OH pada antosianidin, isoflavon, flavon, flavanol (katekin), flavonol, flavanonol, flavanon, dan antosianin. Senyawa flavonoid seringkali muncul dalam bentuk glikosida, yang terikat dengan arabinosa, D-glukosa, galaktosa, L-rhamnosa, dan glukorhamnosa (Tatipamula dan Kukavica 2021).

Pulai tersebar luas secara alami di berbagai wilayah Indonesia dan dikenal sebagai tanaman obat (Zhao *et al.* 2020). Bagian-bagian tanaman pulai seperti batang, daun, akar, dan getah memiliki berbagai kegunaan. Pulai memiliki sifat penyembuhan yang efektif untuk mengatasi berbagai penyakit seperti asma, malaria, demam, diare, epilepsi, penyakit kulit, dan gigitan ular (Dey 2011). Berbagai penelitian biologis dan farmakologis telah dilakukan untuk mengevaluasi klaim tradisional dan etnofarmakologi dari *Alstonia scholaris*. Hingga saat ini, sejumlah aktivitas biologis dan farmakologis seperti antimikroba, antidiare, antioksidan, antidiabetes, antikanker, analgesik, antiinflamasi, hepatoprotektif, efek pada sistem saraf pusat, imunomodulator, penyembuhan luka, antiastmatik, antifertilitas, dan sifat sitotoksik telah dilaporkan, yang ditemukan pada daun, akar, batang, atau kulit dari tanaman pulai (Khyade *et al.* 2014).

Pencernaan *in vitro* merupakan metode yang sering digunakan untuk mensimulasikan proses pencernaan manusia dalam kondisi laboratorium. Metode ini memungkinkan peneliti untuk memahami bagaimana senyawa bioaktif dalam makanan atau obat herbal mengalami perubahan setelah melewati saluran pencernaan. Penelitian ini akan menerapkan metode pencernaan *in vitro* untuk menganalisis perubahan jumlah total flavonoid dalam seduhan daun pulai pada berbagai lama penyeduhan. Penelitian yang dikemukakan oleh Ng dan See (2019) perubahan total flavonoid setelah melalui proses pencernaan *in vitro* pada berbagai pangan nabati mengalami penurunan, berdasarkan penelitian Luo *et al.* (2022) total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* pada *K. coccinea fruits* juga mengalami perubahan terdapat beberapa perlakuan mengalami penurunan dan sebagian yang lain mengalami peningkatan. Menurut penelitian Bhadresha *et al.* (2022) perubahan total flavonoid pada *Moringa oleifera* setelah pencernaan *in vitro* mengalami penurunan. Berdasarkan hal tersebut penelitian ini bertujuan untuk melihat perubahan total flavonoid sebelum dan setelah pencernaan *in vitro* dan memperoleh waktu penyeduhan terbaik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pulai yang diperoleh dari Kecamatan Dramaga Bogor. Bahan yang digunakan untuk mengukur total flavonoid adalah AlCl_3 (Merck), NaOH (Merck),



metanol (Merck), NaNO₂ (Merck), kuersetin (Sigma). Bahan yang digunakan pada simulasi pencernaan *in vitro* adalah enzim pepsin (Merck), NaCl (Merck), HCl (Merck), es batu, aquades, enzim pancreatin (Merck).

Tahapan Penelitian

Ekstraksi penyeduhan daun pulai (Uthai 2021)

Ekstraksi penyeduhan dengan sedikit modifikasi, yaitu daun pulai yang telah dikeringanginkan dan dihancurkan menjadi bubuk diseduh dalam air mendidih dengan konsentrasi 0,04 g/mL selama 5, 10, 15, 20 dan 25 menit. Larutan hasil penyeduhan bubuk daun pulai disaring dengan penyaring vakum, kemudian ditepatkan volume ekstrak pada volume awal dengan penambahan aquades.

Simulasi pencernaan lambung dan usus halus secara *in vitro* (Yamamoto *et al.* 1999)

Simulasi pencernaan *in vitro* sedikit modifikasi. Cairan lambung dibuat dengan mencampurkan 320 mg pepsin babi dan 200 mg NaCl ke dalam 100 mL aquades, kemudian pH-nya disesuaikan menjadi 2,00 menggunakan HCl. Sebanyak 5 mL ekstrak daun pulai ditambahkan ke dalam 5 mL cairan lambung, lalu campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah itu, pH dinaikkan menjadi 7,00 menggunakan NaOH (0,1 N). Cairan usus halus disiapkan dengan menambahkan 1,25 g pancreatin ke dalam 50 mL buffer fosfat (50 mM, pH 8,0). Sebanyak 5 mL cairan usus halus kemudian dicampurkan dengan cairan lambung yang mengandung ekstrak daun pulai dalam rasio 1:1 (v/v). Campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Sampel dari lambung dan usus halus yang telah dicerna kemudian disentrifugasi, dan supernatan yang dihasilkan dianalisis lebih lanjut.

Analisis Total Flavonoid

Analisis total flavonoid dilakukan menggunakan metode yang dilaporkan oleh Abdel-Aleem *et al.* (2019). Sebanyak 0,3 mL sampel dicampurkan dengan 3,4 mL metanol, 0,15 mL NaNO₂ (0,5 M), dan 0,15 mL AlCl₃ (0,3 M). Setelah 5 menit, ditambahkan 1 mL NaOH (1 M). Larutan ini kemudian diaduk dengan baik dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 506 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kurva standar dibuat menggunakan berbagai konsentrasi larutan standar quercetin (10 hingga 400 µg/mL). Konsentrasi total flavonoid dihitung sebagai persentase dari total ekuivalen quercetin per gram ekstrak (mg QE/g).

$$\text{Total flavonoid} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{QE \times V \times D}{W} \times 100\%$$

QE = Konsentrasi (µg/mL)

V = Total volume sampel (mL)

D = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (g)



Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan lama penyeduhan yang terdiri 5, 10, 15, 20, 25 menit dengan ulangan sebanyak 2 kali.

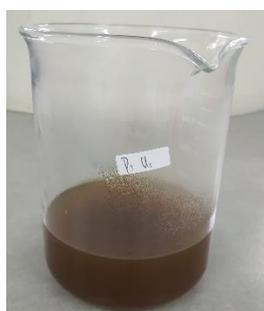
Analisis Data

Data dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh yang nyata, akan dilanjutkan dengan analisis menggunakan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5% untuk menentukan pengaruh antara perlakuan yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total flavonoid sebelum pencernaan *in vitro*

Flavonoid merupakan kelompok besar senyawa alami yang terdapat dalam tumbuhan dan dikenal karena beragam manfaat kesehatannya serta peran pentingnya dalam metabolisme tumbuhan. Flavonoid adalah polifenol dengan struktur dasar yang terdiri dari dua cincin benzena (A dan B) yang dihubungkan oleh rantai tiga karbon yang membentuk cincin oksigen heterosiklik (cincin C). Jumlah flavonoid total dinyatakan dalam *Quercetin Equivalent* (QE) (Salib *et al.* 2013). Kuersetin merupakan bagian dari kelompok flavonol, yang termasuk subkelompok flavonoid. Flavonol adalah polifenol yang memiliki struktur dasar dengan cincin benzena yang terhubung dengan cincin oksigen heterosiklik. Sebagai flavonol, kuersetin memiliki sifat unik yang membedakannya dari subkelompok flavonoid lainnya, seperti flavon, flavanon, flavanonol, flavan-3-ol (katekin), dan antosianidin (Li *et al.* 2019). Penampilan sampel sebelum pencernaan *in vitro* diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Sampel sebelum pencernaan *in vitro*

Hasil pengujian total flavonoid sebelum pencernaan *in vitro* pada sampel yang mengandung flavonoid ditampilkan pada Tabel 1

Tabel 1. Total flavonoid sebelum pencernaan *in vitro*

Perlakuan	Total flavonoid sebelum <i>in vitro</i> (mg QE/g)
5 menit	10,17 ^d ±0,01
10 menit	9,54 ^a ±0,01
15 menit	9,81 ^b ±0,01
20 menit	10,34 ^e ±0,02
25 menit	10,00 ^c ±0,01

Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata±SD (n=2), huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikan 0.05

Berdasarkan Tabel 1 hasil dari total flavonoid terhadap pengaruhnya dalam lama penyeduhan memiliki pengaruh yang signifikan. Kadar total flavonoid sebelum pencernaan *in vitro* berkisar antara 9,54-10,34 mg QE/g. Penyeduhan selama 20 menit memiliki nilai tertinggi, sedangkan lama penyeduhan 10 menit memiliki nilai terendah. Penyeduhan yang lebih lama dari 10 menit cenderung meningkatkan konsentrasi flavonoid, dengan puncaknya pada 20 menit, ini bisa diindikasikan sebagai waktu optimal. Penyeduhan lebih lama (25 menit) dari 20 menit mulai menunjukkan sedikit penurunan, diperkirakan disebabkan oleh degradasi flavonoid lebih lanjut atau interaksi kimia lainnya. Penyeduhan 5 menit menunjukkan adanya transfer massa yang cepat dalam proses ekstraksi, sementara lama penyeduhan 20 menit terdapat fase lanjutan dengan pelarutan flavonoid yang lebih terikat atau lebih dalam struktur daun mulai terlarut (Hobbi *et al.* 2021).

Total flavonoid setelah pencernaan *in vitro*

Total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* mengacu pada jumlah keseluruhan flavonoid yang tersisa dalam suatu sampel setelah menjalani simulasi proses pencernaan dalam kondisi laboratorium yang meniru pencernaan manusia. Pencernaan *in vitro* melibatkan tahapan-tahapan yang menyerupai lingkungan lambung dan usus, termasuk penggunaan enzim seperti pepsin dan pankreatin, serta penyesuaian pH untuk mencerminkan kondisi asam lambung dan pH netral di usus. Menurut Luo *et al.* (2022) setelah proses pencernaan *in vitro*, total flavonoid yang terukur biasanya mengalami penurunan dibandingkan dengan jumlah awal sebelum pencernaan. Penurunan ini bisa disebabkan oleh degradasi enzimatik, perubahan kimiawi, atau interaksi dengan komponen lain selama simulasi pencernaan, yang mengubah struktur flavonoid atau mengkonversinya menjadi senyawa lain yang lebih sederhana dan kurang aktif secara biologis. Penampilan sampel setelah pencernaan *in vitro* diperlihatkan pada Gambar 2.

Gambar 2. Sampel setelah pencernaan *in vitro*

Hasil pengujian total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* pada sampel yang mengandung flavonoid ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Total flavonoid setelah pencernaan *in vitro*

Perlakuan	Total flavonoid setelah <i>in vitro</i> (mg QE/g)
5 menit	2,52 ^{bc} ±0,19
10 menit	2,02 ^a ±0,03
15 menit	2,17 ^{ab} ±0,01
20 menit	2,84 ^c ±0,26
25 menit	2,31 ^{ab} ±0,09

Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata±SD (n=2), huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikan 0.05

Berdasarkan Tabel 2, hasil total flavonoid menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap lama waktu penyeduhan. Kadar total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* berada dalam kisaran 2,02-2,84 mg QE/g. nilai tertinggi terdapat pada lama penyeduhan 20, yaitu 2,84 mg QE/g. Sebaliknya, penyeduhan selama 10 menit memberikan hasil terendah, yakni 2,02 mg QE/g. Hampir sama dengan total flavonoid sebelum pencernaan *in vitro*. Penurunan kadar flavonoid setelah penyeduhan selama 25 menit (menjadi 2,31 mg QE/g) dibandingkan dengan 20 menit mungkin disebabkan oleh degradasi flavonoid atau interaksi kimia lainnya yang terjadi ketika penyeduhan berlangsung lebih lama. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dapat terdegradasi atau mengalami perubahan struktur selama proses penyeduhan yang lebih panjang, terutama setelah mencapai waktu optimum (Jiang *et al.* 2015).

Penurunan total flavonoid

Penurunan total flavonoid merujuk pada berkurangnya jumlah flavonoid yang terukur dalam suatu sampel setelah mengalami suatu perlakuan atau proses tertentu, seperti pencernaan *in vitro*. Menurut Luo *et al.* (2022) penurunan ini dapat terjadi karena berbagai faktor seperti degradasi kimiawi, perubahan struktur flavonoid, atau



konversi menjadi senyawa lain selama proses tersebut. Penurunan total flavonoid yang signifikan dapat mempengaruhi aktivitas biologis dan manfaat kesehatan dari bahan yang diuji, karena jumlah flavonoid yang tersedia untuk tubuh setelah dikonsumsi menjadi lebih rendah.

Hasil penurunan total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* ditampilkan pada Tabel 3

Tabel 3. Persentase penurunan total flavonoid setelah pencernaan *in vitro*

Perlakuan	Penurunan total flavonoid (%)
5 menit	75,22±3,82
10 menit	78,83±3,76
15 menit	77,88±3,82
20 menit	72,53±3,75
25 menit	76,90±3,84

Berdasarkan hasil penurunan total flavonoid pada Gambar 3 total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* mengalami penurunan hampir 50% bahkan lebih. Penyerapan polifenol oleh usus, seperti yang dijelaskan oleh (Ng dan See 2019) dapat dipengaruhi oleh enzim pencernaan seperti pepsin dan pankreatin. Verhoeckx *et al.* (2015) juga menyatakan bahwa kondisi pencernaan dapat menyebabkan perubahan struktur yang mempengaruhi stabilitas senyawa bioaktif. Enzim dan kondisi asam ini dapat mengakibatkan degradasi senyawa flavonoid, sehingga jumlah flavonoid yang dapat terukur setelah pencernaan menurun (Chen *et al.* 2013). Flavonoid juga dapat berinteraksi dengan berbagai komponen dalam saluran pencernaan, seperti protein, lipid, dan karbohidrat. Interaksi tersebut dapat mengikat flavonoid dan mengurangi ketersediaannya untuk diukur sebagai flavonoid bebas (Jiang *et al.* 2015). Temuan ini menggarisbawahi pentingnya memperhitungkan stabilitas flavonoid dalam pengembangan produk makanan dan minuman berbasis flavonoid guna memastikan manfaat kesehatan yang optimal.

KESIMPULAN

Total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* mengalami penurunan. Total flavonoid baik sebelum dan setelah pencernaan *in vitro* dengan lama penyeduhan 20 menit memiliki nilai yang paling tinggi dengan nilai total flavonoid sebelum pencernaan *in vitro* (10,34 mg QE/g), total flavonoid setelah pencernaan *in vitro* (2,84 mg QE/g). Lama penyeduhan 20 menit dapat digunakan sebagai waktu terbaik karena memiliki nilai total flavonoid yang paling tinggi baik sebelum maupun setelah pencernaan *in vitro*.

SARAN

Perlu untuk memperhatikan stabilitas senyawa bioaktif dalam pengembangan produk berbasis daun pulai dan untuk mencapai kadar flavonoid yang optimal, disarankan untuk melakukan penyeduhan selama 20 menit.



DAFTAR PUSTAKA

- Adaramoye OA. 2012. Antidiabetic effect of kolaviron, a biflavonoid complex isolated from *Garcinia kola* seeds, in Wistar rats. *Afr. Health Sci.* 12(4):498–506.doi:10.4314/ahs.v12i4.16.
- Bhadresha KP, Jain NK, Rawal RM. 2022. Assessing the protective effect of *moringa oleifera* extract against bone metastasis: an in vitro simulated digestion approach. *Nutr. Cancer.* 74(3):1023–1036.doi:10.1080/01635581.2021.1933099.
- Chen GL, Hu K, Zhong NJ, Guo J, Gong YS, Deng XT, Huang YS, Chu DK, Gao YQ. 2013. Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially available tea juices measured by an in vitro digestion model. *Eur. Food Res. Technol.* 236(2):303–310.doi:10.1007/s00217-012-1897-2.
- Dey A. 2011. *Alstonia scholaris* R.Br. (Apocynaceae): Phytochemistry and pharmacology: A concise review. *J. Appl. Pharm. Sci.* 1(6):51–57.
- Hobbi P, Okoro OV, Delporte C, Alimoradi H, Podstawczyk D, Nie L, Bernaerts K V., Shavandi A. 2021. Kinetic modelling of the solid–liquid extraction process of polyphenolic compounds from apple pomace: influence of solvent composition and temperature. *Bioresour. Bioprocess.* 8(1):2-14.doi:10.1186/s40643-021-00465-4.
- Jiang W, Wei H, He B. 2015. Dietary flavonoids intake and the risk of coronary heart disease: A dose-response meta-analysis of 15 prospective studies. *Thromb. Res.* 135(3):459–463.doi:10.1016/j.thromres.2014.12.016.
- Khyade MS, Kasote DM, Vaikos NP. 2014. *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex g. don: a comparative review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 153(1):1–18.doi:10.1016/j.jep.2014.01.025.
- Li Jian, Bai L, Li X, He L, Zheng Y, Lu H, Li Jinqi, Zhong L, Tong R, Jiang Z, *et al.* 2019. Antidiabetic potential of flavonoids from traditional Chinese medicine: a review. *Am. J. Chin. Med.* 47(5):933–957.doi:10.1142/S0192415X19500496.
- Luo X, Tian M, Cheng Y, Ji C, Hu S, Liu H, Lu J, Ren J. 2022. Effects of simulated in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activities and potential bioaccessibility of phenolic compounds from *K. coccinea* fruits. *Front. Nutr.* 9(December):1–12.doi:10.3389/fnut.2022.1024651.
- Ng ZX, See AN. 2019. Effect of in vitro digestion on the total polyphenol and flavonoid, antioxidant activity and carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory potential of selected functional plant-based foods. *J. Food Process. Preserv.* 43(4):1–13.doi:10.1111/jfpp.13903.
- Salib JY, Michael HN, Eskande EF. 2013. Anti-diabetic properties of flavonoid compounds isolated from *Hyphaene thebaica* epicarp on alloxan induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res.* 5(1):22–29.doi:10.4103/0974-8490.105644.
- Syarifuddin RN, Trisnawaty A., Nurwidah A. 2021. Identifikasi senyawa kimia pada tanaman pulai (*Alstonia scholaris*) sebagai pestisida nabati untuk pengendali hama. *J. Galung Trop.* 10(April):40–47.
- Tatipamula VB, Kukavica B. 2021. Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell Biochem. Funct.* 39(8):926–944.doi:10.1002/cbf.3667.
- Uthai N. 2021. Effects of temperature, steeping time and particle size used in infusion brewing on total phenolic content and antioxidant activity of tea produced from young upland rice leaves. *African J. Food, Agric. Nutr. Dev.* 21(02):17477–17491.doi:10.18697/ajfand.97.20150.



- Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. 2015. The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models. *Impact Food Bioact. Heal. Vitr. Ex Vivo Model.*:338.1–327.doi:10.1007/978-3-319-16104-4.
- Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.* 10(1):13–18.doi:10.1016/S0955-2863(98)00077-1.
- Zhao YL, Yang ZF, Wu BF, Shang JH, Liu YP, Wang XH, Luo XD. 2020. Indole alkaloids from leaves of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. protect against emphysema in mice. *J. Ethnopharmacol.* 259(March):112949.doi:10.1016/j.jep.2020.112949.