

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Kopi**

##### **1. Definisi Kopi**

Kopi ialah tanaman perkebunan yang telah lama dikembangkan dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Kopi bermula dari Negara Afrika yaitu dari daerah pegunungan Ethiopia. Namun, kopi baru dikenal masyarakat dunia setelah tanaman ini dikembangkan di luar daerah asalnya, yaitu di Arabia selatan, di Yaman (Hamni, 2013). . Selain karena rasanya yang unik faktor sejarah, tradisi, sosial dan kepentingan ekonomi juga menjadi alasan kopi menjadi populer di dunia (Maulidan dan Alam, 2018).

Kopi tubruk adalah kopi hitam yang paling sederhana. Kopi tubruk ini aslinya berasal dari daerah Jawa dan Bali. Seiring dengan waktu dan migrasi penduduk, metode ini digunakan hampir di semua tempat di Indonesia. Kopi tubruk juga merupakan metode tertua. Selama era kolonial, para pedagang Timur Tengah pertama kali memperkenalkan metode penyeduhan ini. Proses pembuatan kopi masih tetap sederhana dan konvensional hingga hari ini (Widayanti et al., 2012). Berdasarkan jenisnya, kopi olahan yang ada di pasaran terbagi menjadi dua jenis yaitu kopi seduh dan kopi instan. Kopi tubruk adalah minuman kopi yang dibuat dengan cara merebus biji kopi bersama gula, yang juga meninggalkan kotoran saat minuman kopi direbus, sedangkan kopi instan dapat berupa campuran kopi, gula, dan susu yang terlebih dahulu melalui proses granulasi dan kemudian digiling dan dikemas dalam aluminium foil dalam toples atau botol. Saat disajikan, kopi instan tidak menyisakan ampas.

## **2. Kandungan Kopi**

Dari senyawa yang terdapat di dalam biji kopi tersebut, diantaranya yang memiliki pengaruh terhadap kesehatan yaitu:

### **a. Kafein**

Salah satu komponen penting dari biji kopi adalah kafein, dimana kafein dapat berperan sebagai stimulan dan faktor penentu rasa (Dewajanti, 2019). Kafein merupakan senyawa alkaloid yang termasuk golongan methylxanthine (1,3,7-trimethylxanthine). Serbuk berwarna putih berbentuk kristal prismatic heksagonal, kafein murni merupakan senyawa yang tidak berbau dan berasa pahit (Hastuti, 2015).

Efek farmakologis kafein sama dengan methylxanthines lainnya, termasuk dalam berbagai teh dan coklat, berupa stimulasi ringan pada sistem saraf pusat, kemampuan mempertahankan aktivitas intelektual, dan mengurangi waktu reaksi. Kafein bertindak sebagai stimulan sistem saraf pusat, melemaskan otot polos, merangsang miokardium, dan merangsang diuresis (Fernandi, 2019). Dalam tubuh manusia, kadar kafein memiliki beberapa efek. Beberapa orang langsung merasakan efeknya, sementara yang lain tidak merasakan efeknya sama sekali. Hal ini terkait dengan karakteristik genetik setiap orang dan kemampuan metabolisme tubuh untuk mencerna kafein. Terlalu banyak kafein dapat menyebabkan gigi berubah warna, bau mulut, peningkatan stres dan tekanan darah (jika dikonsumsi dalam jumlah banyak di pagi hari), insomnia, serangan jantung, stroke, infertilitas pria, gangguan pencernaan, kecanduan, dan bahkan penuaan dini (Hastuti, 2015).

b. Kafestol

Cafestol adalah komponen kopi yang dapat meningkatkan kadar kolesterol dengan mempengaruhi metabolisme kolesterol dengan mempengaruhi reseptor di usus. Secangkir kopi filter rata-rata hanya mengandung 0,1 mg dan kopi tanpa filter mengandung 4-6 mg cafestol per cangkir (Anggraeni, 2016).

Konsumsi kopi yang berlebihan dapat menyebabkan lebih banyak cafestol yang masuk ke dalam tubuh. Hal ini menyebabkan efek kafestol untuk mencegah berlanjutnya proses oksidasi beta yang dapat meningkatkan kadar kolesterol total (Diarti, et al. 2016). Kahweol

c. Kahweol

Kahweol adalah senyawa yang larut dalam lemak yang ditemukan dalam minyak biji kopi yang memiliki sifat anti kanker. Kahweol dalam minyak biji kopi dapat meningkatkan kolesterol darah. Senyawa ini juga dapat menyebabkan rusaknya zat pelindung toksik dan aflatoksin B1. Kopi tanpa filter mengandung 6–12 mg/cangkir, sedangkan kopi yang disaring mengandung 0,2–0,6 mg/cangkir (Rosyidi, 2018).

d. Tigonelline

Senyawa lain yang hadir dalam jumlah yang relatif besar dalam kopi seduh, 5% dari semua senyawa larut dalam kopi seduh, adalah trigonelin. Dibandingkan kafein, trigonelin hanya memiliki sekitar seperempat rasa pahit kafein. Selama proses penyaringan, trigonelin diubah menjadi asam nikotinat (nicotinic acid), sehingga setiap cangkir kopi rata-rata mengandung 0,5 mg nikotin (Rosyidi, 2018).

### **3. Jenis – Jenis Kopi**

#### **a. Kopi arabika**

Kopi Arabika, yang disebut sebagai kopi, memiliki rasa yang lebih lembut dibandingkan dengan kopi Robusta. Kopi ini memancarkan aroma yang menyenangkan seperti perpaduan antara bunga dan buah-buahan, tetapi dikenal karena sedikit rasa pahitnya (Anggara dan Marini, 2011).

#### **b. Kopi robusta**

Kopi robusta memiliki kualitas buahnya lebih rendah dari kopi arabika. Kopi robusta memiliki rasa yang lebih menyerupai coklat, aroma yang dihasilkan khas dan manis, warna bijinya bervariasi tergantung dari cara pengolahannya dan mempunyai tekstur lebih kasar dari kopi arabika (Anggara dan Marini, 2011).

#### **b. Kopi Bubuk**

Hanya ada tiga langkah dalam pengolahan kopi bubuk, yaitu: Memanggang, menggiling dan mengemas. Dimana kopi ini diolah dengan cara dihaluskan. Penyangraian menentukan warna dan rasa produk kopi yang akan dikonsumsi, sedangkan penggilingan menggiling partikel kopi sehingga menghasilkan kopi kasar, sedang, halus dan prima. Pemilihan bubuk kopi kasar dan halus berkaitan dengan cara penyajian kopi yang disukai masyarakat (Wulandari et al., 2019).

### **4. Manfaat Kopi**

Kopi merupakan minuman yang memiliki manfaat baik bagi tubuh jika dikonsumsi dengan jumlah yang normal, adapun manfaat yang ada menurut Kementerian Kesehatan Direktorat Jendral Pelayanan Kesehatan pada tahun 2022 yaitu :

a. Menurunkan Depresi

Salah satu manfaat minum kopi yaitu dapat membantu mengurangi kecenderungan depresi. Minum kopi secara teratur di pagi hari dikaitkan dengan risiko depresi 20% lebih rendah dibandingkan dengan orang yang jarang atau tidak pernah minum kopi.

b. Merangsang Rasa Bahagia

Penelitian yang dilakukan oleh American University menunjukkan bahwa minum kopi bermanfaat untuk meningkatkan rasa bahagia dan percaya diri. Minum kopi meningkatkan produksi hormon serotonin dan dopamin, yang merupakan pemicu kebahagiaan.

c. Menajamkan Daya Ingat

Fakta telah membuktikan bahwa kopi tidak hanya memberikan efek yang baik bagi kondisi mental atau psikologis seseorang, tetapi juga memberikan efek yang baik bagi kesehatan otak jika diminum dengan benar. Minum kopi dapat meningkatkan kapasitas memori otak. Namun, untuk bisa mendapatkan manfaat tersebut, harus mengonsumsinya dalam jumlah sedang dan tidak berlebihan.

d. Memperbaiki Fokus

Kafein dari kopi dapat mempengaruhi fungsi otak. Ketika darah membawa kafein, itu merangsang produksi berbagai hormon dalam tubuh. Kafein merangsang hormon seperti dopamin, serotonin, dan norepinefrin. Dengan ketiga senyawa ini, konsentrasi Anda akan meningkat. Ini mungkin salah satu alasan mengapa mereka yang mengantuk disarankan minum kopi untuk kembali fokus.

## **5. Dampak Konsumsi Kopi Berlebihan**

Selain mempunyai manfaat kopi juga mempunyai kerugian jika kita mengonsumsinya secara berlebih, diantaranya yaitu :

### **a. Meningkatkan Tekanan Darah**

Tekanan darah telah terbukti meningkat 15 menit setelah minum kopi. Hal ini disebabkan adanya reaksi zat yang terkandung dalam kopi dengan tubuh manusia. Peningkatan tekanan toraks dan aktivitas saraf parasimpatis menghambat aliran balik vena akibat konsumsi kopi (Rijal dan Suprihatin, 2014).

### **b. Meningkatkan Kadar Kolesterol Total**

Sebanyak 12 jurnal (85,2%) menyatakan bahwa kopi dapat mempengaruhi kadar kolesterol, terdapat pengaruh yang signifikan antara jumlah mengonsumsi kopi dengan kadar kolesterol dengan 3-5 gelas/hari atau sekitar 400 mL perhari dapat mempengaruhi kadar kolesterol.

Hal ini dikarenakan dalam kopi mengandung senyawa kahweol dan kafestol yang berhubungan dengan metabolisme lipid dan dapat mempengaruhi profil lipid serum. Peningkatan kolesterol darah terutama kolesterol LDL dalam jangka waktu lama menyebabkan terjadinya penimbunan lemak di dalam lapisan pembuluh darah yang membentuk plak kolesterol (Krispila, dkk. 2022).

### **c. Meningkatkan Resiko Terkena Stroke**

Sebuah penelitian yang dimuat dalam *Journal of Neurology*, menyimpulkan bahwa minum lebih dari 5 gelas kopi perhari akan meningkatkan resiko terjadinya kerusakan pada dinding pembuluh darah (Gunawan et al., 2021).

#### d. Mengurangi Kesuburan

Perempuan yang minum empat gelas kopi per hari memiliki risiko tidak subur lebih besar. Sebabnya, kafein mengurangi kandungan darah dalam hormone prolactin (Yulia, dkk. 2022)

#### e. Menyebabkan Jantung Koroner

Menurut Tjay (2015) menyatakan bahwa meminum kopi terlalu banyak dapat meningkatkan resiko penyakit jantung, hal ini karena meningkatkan kadar *homosistein* darah.

## **B. Kolesterol**

### **1. Definisi Kolesterol**

Kolesterol merupakan bagian dari lemak darah yang tidak diperlukan dalam makanan, karena dalam hal ini tubuh telah mensintesis dalam jumlah yang cukup. Kolesterol terjadi dalam makanan dan dalam tubuh terutama sebagai kolesterol bebas atau asam lemak. Kolesterol diperlukan untuk berbagai fungsi seperti pembuatan hormon, membangun dinding sel dan lain-lain (Amaliah, 2014).

Kolesterol total adalah jumlah kolesterol yang terdapat pada semua partikel pembawa kolesterol di dalam darah, meliputi HDL lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), dan very low-density lipoprotein (VLDL) (Susilowati, 2017). Dengan kata lain, kolesterol total adalah penjumlahan dari total kolesterol darah (Selvam, 2017). Kolesterol menghasilkan hormon, melapisi sel-sel saraf agar dapat menyalurkan rangsangan dengan benar, dan membentuk membran luar sel-sel tubuh. Kolesterol merupakan komponen lemak utama dalam tubuh (Kamila dan Salim, 2018). Kadar kolesterol darah total golongan tersebut ditunjukkan pada Tabel 1 (Hesti., 2016).

**Tabel 1 Kategori Kadar Kolesterol Total Darah**

<b>Kadar Kolesterol Total (mg/dl)</b>	<b>Kategori Kadar Kolesterol Total</b>
<200	Normal
200 – 239	Ambang batas
≥240	Tinggi

Sumber : (Hesti dkk., 2016).

## **2. Jenis – Jenis Kolesterol**

Kolesterol yang diproduksi dalam tubuh terdiri dari 2 jenis yaitu :

### **a. High Density Lipoprotein (HDL)**

HDL (*High Density Lipoprotein*) dikenal sebagai kolesterol baik. Terdiri dari protein dan sedikit lemak, HDL membentuk paket yang stabil. Karena kolesterol HDL tidak dipecah, maka tidak mudah menggumpal. *High Density Lipoprotein* (HDL) merupakan kolesterol yang bermanfaat bagi tubuh. Tugas HDL adalah mengangkut LDL dari perifer ke hati. HDL dapat melewati sel endotel pembuluh darah, yang menyerang nukleusnya untuk membawa kolesterol yang terakumulasi kembali ke makrofag. HDL juga memiliki sifat antioksidan, sehingga dapat mencegah oksidasi LDL (Anggraeni, 2016).

### **b. Low Density Lipoprotein ( LDL)**

*Low-density lipoprotein (LDL)* adalah jenis lipoprotein yang membawa kadar kolesterol tertinggi yang didistribusikan ke seluruh tubuh dan arteri. LDL kadang-kadang disebut kolesterol jahat karena bersifat arteriosklerotik (mudah berikatan dengan dinding pembuluh darah) dan dapat menyebabkan penumpukan lemak dan penyempitan arteri (aterosklerosis). *LDL adalah jenis kolesterol* yang dapat berdampak buruk pada tubuh jika memiliki kadar tinggi (Anggraeni, 2016).

## **3. Faktor yang Mempengaruhi Kadar Kolesterol Total**



Kadar kolesterol total ini terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhinya, dimana faktor tersebut yaitu :

a. Faktor Usia

Peningkatan kadar kolesterol dalam kisaran tertentu adalah bagian alami dari proses penuaan. Dengan kata lain, semakin tua usia Anda, semakin tinggi kadar kolesterol darah Anda baik pada pria maupun wanita. Aktivitas reseptor LDL menurun seiring bertambahnya usia, sehingga orang lebih rentan terhadap hiperkolesterolemia seiring bertambahnya usia. (Naue, S. H., Doda, V., & Wungouw, 2016).

Adapun usia menurut Amin, dkk (2017) dikelompokkan menjadi 9 kelompok, yaitu :

- 1) Masa Balita : 0-5 Tahun
- 2) Masa kanak-kanak : 6-11 Tahun
- 3) Masa remaja awal : 12-16 Tahun
- 4) Masa remaja akhir : 17-25 Tahun
- 5) Masa dewasa awal : 26-35 Tahun
- 6) Masa dewasa akhir : 36-45 Tahun
- 7) Masa Lansia Awal : 46-55 Tahun
- 8) Masa lansia akhir : 56-65 Tahun
- 9) Masa manula : 65 keatas

b. Frekuensi Konsumsi Kopi

Kebiasaan mengonsumsi kopi dapat meningkatkan kadar kolesterol darah dan meningkatkan risiko terkena penyakit jantung. Menurut Alifariki (2019) kebiasaan minum kopi diklasifikasikan menjadi:

- a) Minum kopi ringan dimana seseorang dapat mengonsumsi kopi < 200mg/hari (1-2 gelas sehari)
- b) Minum kopi sedang bila seseorang mengonsumsi kopi 200-400 mg /hari (3-5 gelas sehari)
- c) Minum kopi berat dimana seseorang dapat mengonsumsi > 400 mg perhari (>5 gelas sehari)

c. Keturunan

Silsilah penelitian menunjukkan bahwa salah satu faktor genetik mungkin merupakan kecenderungan bawaan untuk memiliki kolesterol tinggi dalam darah karena mengonsumsi makanan yang mengandung lebih banyak kolesterol. Kecenderungan penyakit jantung bawaan juga dapat tercermin dalam faktor risiko seperti diabetes, tekanan darah tinggi, dan obesitas bawaan (Wahyuni, 2014).

d. Lama merokok

Kebiasaan merokok merupakan faktor yang dapat mempengaruhi kadar kolesterol total karena rokok mengandung nikotin yang dapat meningkatkan kadar LDL dan menurunkan kadar HDL dalam darah (Khairunnisa, 2020). Konsumsi rokok dalam waktu yang lama dapat menyebabkan kadar kolesterol total tinggi dalam tubuh.

e. Konsumsi makanan

Peningkatan kadar kolesterol total dalam darah disebabkan oleh asupan lemak jenuh dan kolesterol yang berlebihan dalam makanan sehari-hari. Namun hal ini dapat diminimalisir jika diimbangi dengan konsumsi makanan yang

membantu menurunkan kolesterol, seperti serat yang menghambat penyerapan kolesterol dan membantu mengeluarkannya dari tubuh.

f. Aktivitas

Gaya hidup saat ini menyebabkan kurangnya aktivitas fisik, seperti naik kendaraan bermotor, naik lift, malas berjalan, dan malas berolahraga. Kurangnya aktivitas fisik dapat meningkatkan kadar kolesterol jahat dan menurunkan kadar kolesterol baik. Selain itu, kurangnya aktivitas fisik juga merupakan faktor risiko penyakit jantung (Widayanti, et al, 2012).

g. Jenis Kelamin

Selama masa kanak-kanak, wanita memiliki kadar kolesterol yang lebih tinggi daripada pria. Pria memiliki kolesterol yang jauh lebih rendah ketika mereka masih muda karena meningkatnya pengaruh hormon testosteron pada masa ini. Pria dewasa yang berusia di atas 20 tahun umumnya memiliki kadar kolesterol yang lebih tinggi daripada wanita. Setelah menopause, wanita memiliki kadar kolesterol yang lebih tinggi daripada pria. Hal ini karena ketika seorang wanita mengalami menopause, hormon estrogen menurun.

h. Lama konsumsi kopi

Seseorang yang minum kopi dalam waktu lama memiliki efek yang tidak baik untuk tubuh kita. Kopi mengandung bahan-bahan seperti kafein, kafestol, dan kahweol yang meningkatkan kolesterol. Khususnya zat Cafestol yang meningkatkan kolesterol LDL tubuh sebesar 1% (Zindany dan Kadri, 2014). Hal ini meningkatkan jumlah kolesterol LDL yang terbuat dari alkohol kopi dalam kopi, menyebabkan pembentukan plak yang lebih mudah menempel dan menggumpal di lapisan pembuluh darah. Plak kolesterol LDL menumpuk dan

menggumpal di dinding pembuluh darah sehingga menyebabkan pembuluh darah menyempit, yang berujung pada pembuluh darah dan dapat meningkatkan risiko penyakit jantung. Artinya, semakin lama kopi dikonsumsi, semakin banyak bahan kimia yang menumpuk di dalam tubuh sehingga meningkatkan kadar kolesterol (Rosyidi et al. 2018).

i. Hubungan Kolesterol dengan Konsumsi Kopi

Kopi mengandung kafein, cafestol, dan kahweol, yang terkait dengan metabolisme lipid dan secara teoritis dapat memengaruhi kadar lipid dalam darah. Senyawa cafestol dan kahweol adalah alkohol diterpen pentasiklik. Cafestol adalah komponen utama dalam reaksi penyabunan minyak kopi dan menyumbang sekitar 0,2-0,6% dari berat kopi. Hasil penelitian menunjukkan adanya hubungan positif antara asupan cafestol dan kahweol dengan peningkatan kolesterol serum, lipoprotein densitas rendah plasma dan homosistein, yang secara tidak langsung dapat meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular (Diarti et al, 2016).

f. Metabolisme Kolesterol

Kolesterol diserap dari usus dan dimasukkan ke dalam kilomikron yang dibentuk oleh selaput lendir. Lemak yang masuk ke dalam tubuh bersama makanan diubah menjadi kolesterol, trigliserida, fosfolipid, dan asam lemak bebas. Konversi ini terjadi di dalam usus selama pencernaan dan masuk ke dalam darah. Kolesterol dan lemak lainnya (trigliserida dan fosfolipid) diangkut dalam darah dan harus bergabung satu sama lain untuk membentuk senyawa yang dapat larut. Kilomikron adalah lipoprotein yang berperan mengangkut lemak ke hati hingga unsur-unsur lemak yang saling berikatan berubah lagi dan menjadi tidak terikat (Widmann, 2012).

Asam lemak yang dihasilkan disimpan sebagai sumber energi. Kolesterol diproduksi oleh sel-sel hati ketika kadar kolesterol tidak mencukupi. Hasil produksi hepatosit dibawa oleh lipoprotein ke jaringan tubuh yang mengolah hepatosit, seperti sel otot jantung otak. Kelebihan kadar kolesterol diangkut ke jaringan tubuh oleh lipoprotein dan diekskresikan atau didegradasi dan dilepaskan ke dalam kantong empedu menjadi empedu (Nurrahmani, 2012).

#### 4. Gejala Kolesterol Tinggi

Gejala-gejala umum dari seseorang yang memiliki kadar kolesterol dalam darahnya yang tinggi umumnya tidak terlihat dengan mudah bahkan tidak menimbulkan gejala apa pun secara khas. Namun sebagian orang memiliki gejala kolesterol tinggi. Gejala kolesterol tinggi yaitu:

- a. Rasa sakit di tengkuk kepala bagian belakang.
- b. Pegal terasa sampai ke pundak
- c. Kaki yang bengkak
- d. Mudah lelah
- e. Cepat mengantuk (Annisa.2012)

Biasanya orang yang tidak merasakan gejala awal seperti diatas, mereka akan mengetahui memiliki kadar kolesterol tinggi setelah adanya serangan jantung atau stroke pada dirinya. Karena itu untuk dapat mengetahui keadaan kolesterol di dalam tubuh seseorang, diperlukan pemeriksaan khusus dengan pengambilan darah dari pasien dan pengukuran kadar kolesterol di dalam darah (Chairinniza. n.d.).

### **C. Metode Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total**

Pemeriksaan kadar kolesterol darah yaitu digunakan untuk memeriksa kadar kolesterol total dalam tubuh seseorang. Cara pemeriksaan kadar kolesterol terdapat 3 metode yaitu :

#### **2. Metode CHOD-PAP**

Cholesterol Oxidase Para Amino Phenazone (CHOD-PAP) merupakan metode untuk melakukan pemeriksaan kolesterol di laboratorium rumah sakit atau laboratorium besar. Metode CHOD-PAP memberikan hasil yang lebih akurat, pemeriksaan yang dilakukan dengan metode ini dilakukan oleh petugas laboratorium klinik. Kerugian dari metode ini adalah membutuhkan jumlah darah yang lebih banyak, harganya lebih mahal dan membutuhkan waktu lama untuk menunggu hasil yang diinginkan (Kristiningrum, 2018).

#### **3. Metode Point of Care Testing (POCT)**

Metode POCT adalah rangkaian pemeriksaan laboratorium sederhana dengan menggunakan alat ukur. Metode POCT ini digunakan hanya untuk sampel darah kapiler, tidak digunakan untuk sampel berupa serum atau plasma. Penggunaan metode POCT karena biayanya yang dikeluarkan cukup murah dan hasil yang relatif singkat. Hanya sedikit sampel darah yang diperlukan untuk alat ini, sehingga digunakan darah kapiler. Pengendalian kolesterol total darah di tempat pelayanan (point of care) Pemeriksaan kolesterol total darah terdiri dari alat ukur, strip tes kolesterol total darah dan lancet auto click. Kolesterol meter merupakan alat yang mengukur kadar kolesterol darah total berdasarkan deteksi elektrokimia dengan melapisi strip membran dengan enzim kolesterol oksidase (Menkes, 2014).

Terdapat kelebihan dan kekurangan dari metode POCT (Point of Care Testing) ini, yaitu sebagai berikut :

Kelebihan :

- a) instrument pada saat digunakan.sangat mudah dan efisien
- b) Penggunaan jumlah sampel sedikit.
- c) Mengurangi tahap pra analitik,sehingga dapat mengurangi kemungkinan kesalahan pada tahap ini.
- d) Hasil dapat diketahui lebih cepat
- e) Mengurangi waktu kunjungan klinik rawat jalan dan penggunaan waktu tenaga kesehatan yang lebih optimal.
- f) Pemeriksaan POCT ini dapat dilakukan sendiri. (Yunieka, dkk. 2020)

Kekurangan :

- a) Hasil pemeriksaan metode POCT ini kurang akurasi dan presisi jika dibandingkan dengan hasil dari laboratorium klinik.
- b) Proses QC ( *Quality Control*) belum baik.
- c) Pemeriksaan masih menggunakan metode yang invasive. (Yunieka, dkk. 2020)

#### **4. Metode Lieberman-Buchard**

Dasarnya adalah kolesterol dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat membentuk warna hijau kecoklatan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 546 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Kelemahan dari metode ini adalah perbedaan pengendapan warna antara reaksi pengikatan kolesterol, hemoglobin, bilirubin, iodida, salisilat, vitamin, dan steroid selain vitamin D (Titianasari, 2019).