

DETEKSI ERGOSTEROL SEBAGAI INDIKATOR KONTAMINASI CENDAWAN PADA TEPUNG TERIGU

[Ergosterol Detection as an Indicator of Fungal contamination in Wheat Flour]

A. Rika Pratiwi ¹⁾, dan Anjarsari ²⁾

¹⁾ Jurusan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Unika Soegijapranata

²⁾ Alumni Jurusan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Unika Soegijapranata

ABSTRACT

Fungal contamination of foodstuffs or foods during the storage period is becoming a serious matter. Quantification method is needed for qualifying storage method and its evaluating contaminant so that a quick fungal and its metabolite detection can be used to prevent further contamination. One detecting method was measuring ergosterol content. Ergosterol is a sterol group compound, which is a constituting component of specific membrane on fungi and it does not exist on other microorganisms. The objective of the research is to describe fungal contamination in wheat flour during the storage period based on its ergosterol content. Ergosterol evaluation and microbiological evaluation are aimed to determine the content of ergosterol and to determine fungal species. Ergosterol content is measured by HPLC and fungal species is determined by the isolation and microscopic identification. The result of this research is fungal contamination can be detected by ergosterol evaluation and microbiological. The lowest detected ergosterol content was 0.211 ppm. Ergosterol content increased significantly during storage period which indicates that fungal contaminant level increased is well. The determined fungi species were found in high and low gluten of wheat flour which were potential to produce mycotoxin.

Key words - Ergosterol, fungi, and mycotoxin

PENDAHULUAN

Di Indonesia, tepung terigu sudah merupakan bahan baku makanan yang sangat diterima di masyarakat luas sebagai bahan pembuat aneka makanan, terutama produk bakery. Oleh karena sifat kimia, biologis dan fisiknya maka sangat memungkinkan berbagai macam mikroorganisme dapat tumbuh dengan baik dan pada bahan pangan yang biasanya bersifat sangat spesifik dan sangat tergantung jenis bahan serta kondisi tertentu dari penyimpanannya.

Adanya mikroorganisme yang tumbuh di suatu bahan pangan sangat berpengaruh pada kualitas produknya. Secara spesifik dikatakan bahwa tepung terigu yang terkontaminasi fungi akan berpengaruh pada produk olahannya seperti roti dan pastry karena akan menyebabkan penurunan kualitas. Meskipun fungi biasanya mati dengan proses baking, namun rekontaminasi tersebut biasanya terjadi setelah baking, (Bulleman & Hartung, 1973 op cit Weidenbömer, et al., 2000). Sedangkan pada saat mencampur adonan, kontaminasi fungi dapat berasal dari lingkungannya dan lebih lanjut pertumbuhan fungi pada tepung, roti dan pastry dapat menyebabkan kontaminasi mikotoksin (Hesseltine, 1976; Spicher, 1984 op cit Weidenbömer, et al., 2000).

Hal tersebut sesuai dengan kekhawatiran yang dikemukakan Syarif dan Halid (1993) bahwa fungi yang

tumbuh dalam tepung terigu sangat memungkinkan mengeluarkan mikotoksin pada kondisi tertentu atau selama penyimpanan. Mikotoksin merupakan bagian dari metabolit sekunder pada fungi yang dapat mengkontaminasi makanan dan dapat menyebabkan keracunan pada manusia (Moss, 1992). Beberapa sistem organ yang dapat terserang akibat toksin dari fungi misalnya central nervous system, gastro intestinal system, liver, ginjal dan kulit (Hsieh, 1989 op cit Natori, et al., 1989).

Dengan demikian penentuan tingkat kontaminasi fungi pada bahan makanan atau makanan terutama selama penyimpanan menjadi masalah serius, yaitu masalah kerusakan produk, produksi mikotoksin dan kemungkinan besar dihasilkannya spora penyebab alergi. Menurut Schnurer (1992), metode kuantifikasi yang dapat diandalkan dan terpercaya sangat dibutuhkan untuk memperbaiki teknik penyimpanan dan untuk mengevaluasi produk mengenai tingkat kontaminasi fungi. Artinya bahwa sangat diperlukan metode yang tepat dan cepat untuk mendeteksi sedini mungkin keberadaan fungi dan metabolitnya pada bahan pangan untuk mencegah kontaminasi lebih lanjut.

Salah satu metode untuk mendeteksi ada tidaknya fungi serta seberapa besar keberadaannya adalah dengan mengukur ergosterol. Ergosterol adalah komponen dominan sterol pada sebagian fungi (Weete, 1974 op cit Seitz, et al., 1977). Ergosterol adalah golongan sterol yang

merupakan komponen penyusun membran spesifik pada *fungi* dan tidak terdapat pada mikroorganisme lain. Hal itu karena secara alamiah ergosterol adalah tujuan akhir jalur primer dari sterol yang merupakan komponen penyusun membran (Nes, 1974 *op cit* Seitz, et al., 1977), yaitu suatu membran lipid yang spesifik pada *fungi* (Weete, 1974 *op cit* Schnurer, 1992). Sterol berfungsi sebagai komponen membran, dan mempunyai efek yang berarti pada permeabilitas dari *fungi* (Elliott, 1977 *op cit* Griffin, 1981). Selain dengan mengukur kandungan ergosterol, sebenarnya telah ada metode untuk mengetahui adanya *fungi* dalam makanan secara konvensional yang telah banyak dilakukan selama ini, yaitu dengan menggunakan metode mikrobiologis, namun metode ini hanya dapat mendeteksi *fungi* dalam keadaan hidup dan memerlukan waktu inkubasi beberapa hari (Seitz, et al., 1977). Sedangkan pada analisa ergosterol dapat mendeteksi secara menyeluruh, cepat, akurat dan sensitifitasnya dapat mencapai hingga skala ppm (*part per million*). Adanya kandungan ergosterol pada beberapa kapang telah dibuktikan pada penelitian yang dilakukan Schnurer (1992) yaitu yang menunjukkan bahwa kandungan ergosterol dalam miselium kapang (b/b dari berat kering) pada *Fusarium culmorum* 0,14%, *Penicillium rugulosum* 0,14% dan *Rhizopus stolonifer* 0,014%. Penelitian lain yang dilakukan Wibowo, et al. (1995) menunjukkan bahwa kadar ergosterol *Aspergillus flavus* 0,5-0,8% dan *Penicillium citrinum* 1,9-2,4%b/b.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memberikan gambaran bahwa kontaminasi *fungi* pada tepung terigu selama penyimpanan dapat terdeteksi berdasarkan kandungan ergosterolnya.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Sampel tepung terigu menggunakan tepung terigu gluten tinggi (kadar protein 12%, kadar air 14%) dan tepung terigu gluten rendah (kadar protein 8-9%, kadar air 14%) dengan masa penyimpanan selama 140 hari. Penyimpanan tepung terigu dilakukan pada kondisi penyimpanan suhu 26-27°C dan RH 79-80%. Tepung tersebut disimpan dengan menggunakan kantong plastik jenis *polycello* yang terdiri atas OPP (*Oriented Polypropilene*) dengan ketebalan 20 µm berlapis PE (*Polyethilene*) dengan ketebalan 35 µm. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisa ergosterol adalah metanol, heksana, KOH, aquades dan ergosterol standart. Bahan yang digunakan untuk uji mikrobiologi adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*), asam laktat 50% dan PGYA (*Pepton Glucose Yeast Extract Agar*).

Peralatan yang digunakan untuk analisa ergosterol terdiri atas timbangan analitik, *shaker*, labu bundar,

kondensor, pemanas listrik, corong pisah/ *separatory funnel*, alat-alat gelas, Whatman Millipore-0,45 µm Nylon filter, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan kolom phenumenox RP 18-5µ. Peralatan untuk uji mikrobiologi terdiri atas petridis, inkubator, *autoclave*, LAF (*Laminar Air Flow*), kaca preparat dan mikroskop.

Metode

Penelitian ini terdiri atas dua tahap pengujian yaitu analisis ergosterol dan uji mikrobiologi. Pengujian dilakukan selama 140 hari setiap 2 minggu sekali. Analisis ergosterol, terdiri atas ekstraksi yang dilanjutkan dengan pengukuran kadar ergosterol menggunakan HPLC. Pengujian setiap 2 minggu sekali. Sampel sebanyak 25 gram dan ditambahkan metanol : heksana (80:20, v/v) dan dikocok menggunakan *shaker*. Cairan disaring kemudian dilakukan saponifikasi dengan penambahan 2 gram KOH pada 20 ml ekstrak jernih. Cairan dididihkan selama 20 menit dalam labu bundar yang dilengkapi kondensor. Setelah ekstrak dingin ditambah dengan 5 ml aquades dan dipindahkan ke dalam corong pisah kemudian dikocok kuat selama 15 detik. Ekstraksi dilakukan lagi dengan 2 x 5 ml heksana. Lapisan heksana diambil dan dikumpulkan, kemudian diuapkan hingga kering dan residu dilarutkan dalam 1 ml metanol. Residu yang sudah dilarutkan dalam metanol tersebut disaring dengan Whatman Millipore - 0,45 µm Nylon filter. Hasil ekstraksi yang diperoleh disuntikkan ke dalam HPLC. Sebelum hasil ekstraksi sampel disuntikkan, terlebih dahulu menyuntikkan ergosterol standar dengan metanol dengan konsentrasi tertentu hingga didapatkan *peak* yang menunjukkan terdeteksinya kadar ergosterol. Fase gerak yang digunakan metanol : air (95:5 v/v) dengan *flow rate* 0,7 ml/ menit. Kolom yang digunakan adalah phenumenox RP 18-5µ, dan detektor diatur dengan panjang gelombang 282 nm (Seitz et al., 1977).

Uji mikrobiologi, terdiri atas isolasi yang dilanjutkan identifikasi mikroskopik. Isolasi kapang dan khamir menggunakan metode langsung dengan media tanam kapang PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang mengandung asam laktat 50% dan khamir dengan PGYA (*Pepton Glucose Yeast Extract Agar*). Kemudian diinkubasikan selama 1-4 hari pada suhu 30°C. Identifikasi kapang dan khamir dengan cara dibuat *slide culture* (Lay, 1994) lalu dicocokkan sifat morfologinya secara mikroskopik berdasarkan Cappuccino & Sherman (1983), Lay (1994) dan Samson, et al., (1995).

Analisa data hasil pengukuran kandungan ergosterol tepung terigu dengan menggunakan anova satu arah. Anova satu arah untuk menganalisa pengaruh waktu penyimpanan masing-masing tepung terigu terhadap kadar ergosterolnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 1 dan Tabel 2 menggambarkan data tentang jenis *fungi* dan konsentrasi ergosterol yang ditemukan selama penyimpanan 14 hari hingga 140 hari.

Penentuan kadar ergosterol dapat dijadikan indikator kontaminasi *fungi* (kapang dan khamir), diperlihatkan pada Tabel 1 dan 2. Pada tabel tersebut terlihat bahwa pada semua sampel yang diuji dengan analisa ergosterol dan uji mikrobiologi (hasil isolasi dan identifikasi) terdeteksi sejumlah ergosterol, dan juga mengandung kapang dan khamir. Artinya, kedua analisa tersebut menunjukkan hasil positif. Hal ini seperti yang dijelaskan dalam Deacon (1980) bahwa ergosterol adalah golongan sterol yang mempunyai komponen plasmalema kapang. Ditambahkan oleh Seitz, et al., (1977) bahwa ergosterol dapat digunakan sebagai indikator efektif untuk dasar kontaminasi *fungi* dan berkorelasi dengan pertumbuhannya karena konsentrasinya dalam miselium kapang pada umumnya tetap dan merupakan komponen utama.

Kadar terkecil ergosterol yang dapat terdeteksi terlihat sangat kecil yakni 0,211 ppm (Tabel 1). Terdeteksinya hingga skala bpj (bagian per sejuta = ppm) karena ergosterol dapat menyerap sinar ultraviolet antara 300-240 nm, sehingga sangat memungkinkan dilakukan analisis secara spektrofotometri. Dengan menggunakan HPLC maka hal tersebut sangat memungkinkan mendeteksi kontaminan *fungi* secara tepat dan cepat. Meskipun rumit, namun metode pengukuran ergosterol dengan HPLC dapat dengan cepat dan sensitif mendeteksi ergosterol sebagai suatu penanda biokimia dari kontaminasi *fungi* pada makanan berupa biji-bijian (Rao, et al., 1989).

Pada Tabel 1 dan Tabel 2 juga terlihat bahwa selama penyimpanan, dari umur simpan 14 hari hingga 140 hari kandungan ergosterolnya semakin tinggi, artinya tingkat kontaminasi *fungi* juga semakin tinggi. Hal ini dikarenakan kadar ergosterol memang berkorelasi positif terhadap berat kering dan panjang hifa *fungi*, demikian seperti yang diungkapkan Schnurer (1992). Pada penelitian ini tepung terigu disimpan pada suhu dan kelembaban yang biasa terdapat pada kondisi penyimpanan rumah tangga. Meskipun masih pada awal penyimpanan tetapi tepung terigu tersebut sudah terkontaminasi. Hal ini dikarenakan, tepung terigu merupakan produk yang berasal dari serealida dan telah mengalami beberapa tahapan pengolahan tertentu. *Fungi* dapat hadir ketika masih dalam bentuk bulir gandum yang bisa sebagai penyakit atau hama pada tanaman gandum itu sendiri, kemudian dapat terikut sporanya ketika pada proses penggilingan, selanjutnya terdapat dalam tepung terigu. Seperti yang diungkapkan oleh Christen & Cohen (1950) *op cit* Weidenbömer, et al.

(2000) bahwa spora *fungi* dapat tertinggal dalam tepung terigu selama beberapa tahun terutama selama proses penyimpanan karena miselium kapang yang sudah berada dalam bulir gandum akan menempel pada lapisan perikarp gandum dan konidianya akan melekat erat pada permukaan biji sehingga akan terikut dalam proses penggilingan. Spora selanjutnya akan tumbuh sesuai kondisi penyimpanannya.

Semakin tinggi tingkat kontaminasi *fungi* yang ditunjukkan dengan semakin tingginya kadar ergosterol selama penyimpanan merupakan petunjuk bahwa ada peningkatan jumlah, jenisnya maupun kelimpahannya. Menurut Robinson & Howell (1985) dikatakan bahwa jenis mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang biak di dalam bahan pangan dipengaruhi oleh faktor kimia, fisik dan biologi dari bahan pangan itu sendiri dan faktor lain sesuai kondisi penyimpanan. Faktor-faktor tersebut juga menjadi penyebab adanya kemunculan jenis *fungi* yang berbeda-beda pada setiap umur simpan (lihat Tabel 1 dan 2). Meskipun berbeda-beda namun secara keseluruhan jenis kapang yang ditemukan didominasi oleh *Aspergillus* dan *Penicillium* yang keduanya ternyata merupakan mikoflora gandum disamping *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladospora*, *Diplodia*, dan *Mucor*. Selain itu juga merupakan *fungi* yang dominan pada tepung baru terutama *P. citrinum* dan *P. roqueforti* yang dapat menyebabkan kerusakan produk adonan pada proses pendinginan (Groves & Hesseltine, 1996; Hesseltine, 1969 dalam Makfoeld (1993). Sedangkan *Rhizopus* yang ditemukan menurut Syarif & Halid (1993) merupakan kapang intermedier disamping *Fusarium*, *Cladosporium* dan *Culvuraria*. Kapang intermedier adalah kapang prapenen yang berkembang pada awal penyimpanan dan bertahan untuk beberapa waktu selama penyimpanan kemudian perkembangannya akan menurun sangat tajam.

Pada Tabel 3 dan Tabel 4 menunjukkan bahwa pada berbagai umur simpan ternyata ditemukan berbagai jenis kapang yang memproduksi toksin. Dengan adanya data tersebut maka deteksi sedini mungkin yang akurat dan cepat memang sangat diperlukan. Hal tersebut juga akan berguna agar teknik penyimpanan serta penetapan angka bagi faktor-faktor yang menjadi pendukung timbulnya kontaminasi *fungi* (terutama kadar air) sungguh diperhatikan oleh para produsen. Terlebih telah diketahui bahwa kontaminasi kapang pada tepung jarang terlihat oleh mata, sehingga dapat menimbulkan masalah yang besar bila ternyata kapang tersebut memproduksi mikotoksin yang merupakan bentuk kontaminasi lebih lanjut dari *fungi*.

Tabel 1. Jenis kapang dan khamir pada tepung terigu gluten rendah selama penyimpanan

Jenis Fungi yang ditemukan	Waktu Simpan (hari)									
	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3. <i>Aspergillus penicilloides</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4. <i>Penicillium citrinum</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5. <i>Penicillium frequentans</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6. <i>Penicillium roqueforti</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
7. <i>Penicillium verrucosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8. <i>Mucor racemosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
9. <i>Rhizopus oligosporus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10. <i>Hansenula sp</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
11. <i>Saccharomyces sp</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Total kadar ergosterol (ppm)	0,211 ± 0,244 c	0,824 ± 0,328 abc	0,454 ± 0,214 c	0,820 ± 0,710 abc	0,622 ± 0,145 bc	1,218 ± 0,193 ab	1,266 ± 0,173 ab	1,532 ± 0,122 a	1,737 ± 0,060 a	1,047 ± 0,588 abc

Keterangan : + : terdapat fungi

- : tidak terdapat fungi

Huruf berbeda pada masing-masing perlakuan menunjukkan beda nyata pada tingkat kepercayaan 99% (p < 0,01)

Tabel 2. Jenis kapang dan khamir pada tepung terigu gluten tinggi selama penyimpanan

Jenis Fungi yang ditemukan	Waktu Simpan (hari)									
	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
2. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
3. <i>Aspergillus penicilloides</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. <i>Penicillium frequentans</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
5. <i>Penicillium cammemberti</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6. <i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
7. <i>Hansenula sp</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
8. <i>Saccharomyces sp</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Total kadar ergosterol (ppm)	0,733 ± 0,136 abc	0,660 ± 0,080 ab	0,753 ± 0,155 abc	0,692 ± 0,114 ab	0,644 ± 0,148 a	1,566 ± 0,854 bcd	1,037 ± 0,517 abc	1,553 ± 0,097 cd	2,104 ± 0,081 d	2,818 ± 0,493 d

Keterangan : + : terdapat fungi

- : tidak terdapat fungi

Huruf berbeda pada masing-masing perlakuan menunjukkan beda nyata pada tingkat kepercayaan 99% (p < 0,01)

Tabel 3. Jenis mikotoksin yang dihasilkan joleh cendawan yang ditemukan pada tepung terigu gluten rendah selama penyimpanan 14 hingga 140 hari

Jenis Fungi yang ditemukan	Waktu Simpan (hari)										Mikotoksin yang dihasilkan *
	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140	
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	Fumigaclavins, Fumagilin, Fumigatin, Fumitoxins, Fumitremorgin A & C, Gliotoxin, Spinulosin, Tryptoquivalins, Verrucologen
2. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Malformins, Naphthoquinones, Nigragi
3. <i>Aspergillus penicilloides</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
4. <i>Penicillium citrinum</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Citrinin
5. <i>Penicillium frequentans</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6. <i>Penicillium roqueforti</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Patulin, Requefortine
7. <i>Penicillium verrucosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Citrinin, Ochratoxin A
8. <i>Mucor racemosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9. <i>Rhizopus oligosporus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10. <i>Hansenula sp</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11. <i>Saccharomyces sp</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-

Keterangan : + : terdapat *fungi*

- : tidak terdapat *fungi*

* : berdasarkan Smith, et al., (1994)

Tabel 4. Jenis mikotoksin yang dihasilkan oleh cendawan yang ditemukan pada tepung terigu gluten tinggi selama penyimpanan 14 hingga 140 hari

Jenis Fungi yang ditemukan	Waktu Simpan (hari)										Mikotoksin yang dihasilkan *
	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140	
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Fumigaclavins, Fumagilin, Fumigatin, Fumitoxins, Fumitremorgin A & C, Gliotoxin, Spinulosin, Tryptoquivalins, Verrucologen
2. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	Malformins, Naphthoquinones, Nigragi
3. <i>Aspergillus penicilloides</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
4. <i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
5. <i>Penicillium frequentans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Cylophia Zonic Acid
6. <i>Penicillium roqueforti</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	Citrin
7. <i>Hasenula sp</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8. <i>Saccharomyces sp</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

Keterangan : + : terdapat *fungi*

- : tidak terdapat *fungi*

* : berdasarkan Smith, et al., (1994)

KESIMPULAN

Analisa ergosterol dapat digunakan untuk menentukan kontaminasi *fungi* karena dapat terdeteksi sejumlah ergosterol dan teridentifikasinya kapang maupun khamir hasil uji mikrobiologi. Kadar ergosterol terkecil yang dapat terdeteksi adalah 0,211 ppm.

Selama penyimpanan tepung terigu ditemukan bahwa kandungan ergosterol semakin tinggi sesuai umur simpannya yang berarti semakin tinggi tingkat kontaminasi *fungi*.

Selama penyimpanan telah ditemukan kontaminan kapang pada tepung terigu gluten tinggi dan gluten rendah yang mempunyai potensi memproduksi mikotoksin.

DAFTAR PUSTAKA

- Deacon, J. W. (1980).** Introduction to Modern Mycology. Blackwell Scientific Publications. London.
- Griffin, D. H. (1981).** Fungal Physiology. John Wiley & Sons. New York.
- Lay, B. W. (1994).** Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Makfoeld, D. (1993).** Mikotoksin Pangan. PAU Pangan dan Gizi UGM. Kanisius. Yogyakarta.
- Moss, M. O. (1992).** Microbial Food Poisoning. Chapman & Hall. London.
- Natori, S., K. Hashimoto & Y. Ueno (ed.) (1989).** Mycotoxins and Phycotoxins '88. Elsevier. Amsterdam.
- Rao, B. S., V. S. Rao, Y. Ramakrishna, R.V. Bhat (1989).** Rapid and Specific Method for Screening Ergosterol as an Index of Fungi Contamination in Cereal Grains. Food Chemistry 31 : 51-56.
- Robinson, C. W. & J. A. Howell (1985).** The Practice of Biotechnology : Speciality Products and Service Activities. In M. M. Young (eds.) Comprehensive Biotechnology : The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Pergamon Press. USA.
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (eds.) (1995).** Introduction to Food-Borne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Netherlands.
- Schnurer, J. (1992).** Comparison of Methods for Estimating the Biomass of Three Food-Borne Fungi with Different Growth Patterns. Applied and Environmental Microbiology. 59(2):552-555.
- Seitz, L. M., H. E. Mohr, R. Burroughs, & D. B. Sauer. (1977).** Ergosterol as an Indicator of Fungal Invasion in Grain. Cereal Chem. 54: 1207-1217.
- Smith, J. E., C. W. Lewis, J. G. Anderson, G. L. Salomons (1994).** Mycotoxins in Human Nutrition and Health. European Commission Directorate-General XII for scientific research and development.
- Syarief, R. & H. Halid (1993).** Teknologi Penyimpanan Pangan. Arcan. Jakarta.
- Weidenbörner, M., C. Wieczorek, S. Appel & B. Kunz (2000).** Whole Wheat and White Wheat Flour-The Mycobiota and Potential Mycotoxins. Food Microbiology. 17:103-107.
- Wibowo, S. Marlia & E. K. Rahmana. (1995).** Penentuan Kuantitatif Biomassa Jamur Toksik pada Sampel Makanan Menggunakan Metode Analisis Ergosterol. Laporan Penelitian – ITB.