Isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidayakan di Kecamatan Dimembe Kabupaten Minahasa Utara
Tahun 2019

(Isolation and identification of pathogenic bacteria in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in Dimembe District, North Minahasa Regency in 2019)

Arfiandi¹, Reiny A. Tumbol²

¹⁾ Mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan FPIK Unsrat Manado
²⁾ Staf pengajar pada Program Studi Budidaya Perairan FPIK Unsrat Manado Penulis korespondensi: R. A. Tumbol, reinytumbol@yahoo.com

Abstract

This study aimed to identify the type of pathogenic bacteria that attack tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in Dimembe District, North Minahasa Regency in 2019. The benefit of this research were to obtain information about the types of bacteria in tilapia (Oreochromis niloticus), so prevention efforts can be made or treatment of the disease. Tilapia as a research sample obtained from existing cultivation sites in the District of North Minahasa Dimembe, North Sulawesi Province. From each location 5-10 individuals were taken with a size of 5-12 cm. The samples were then taken to the laboratory for bacterial isolation. The media for growing bacteria was TSA (Tryptic Soya Agar). The results obtained were adjusted to the Bacterial Fish Pathogens identification book. The data obtained were analyzed descriptively through the presentation of tables and figures. Research results found the bacteria that infected tilapia in North Minahasa Regency including *Aeromonas* sp, *Plesiomonas* sp, *Flavobacterium* sp and *Enterobacter* sp. Regular and continuous monitoring of fish diseases is needed to monitor the spread of fish diseases, especially quarantine fish diseases in North Minahasa Regency.

Keywords: Oreochromis niloticus, isolation, pathogenic bacteria.

PENDAHULUAN

Penyakit dapat disebabkan oleh beberapa jenis patogen seperti, virus, parasit, jamur dan bakteri, beberapa jenis bakteri yang umum menyerang ikan air tawar seperti *Aeromonas sp.* dan *Streptococcus sp.* Penyakit yang disebabkan oleh bakteri memperlihatkan gejala-gejala seperti

kehilangan nafsu makan, luka-luka pada permukaan tubuh, pendarahan pada insang, perut membesar berisi cairan, sisik lepas, sirip ekor lepas, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan dan kerusakan pada hati, ginjal dan limpa (Ashari *dkk.*, 2014).

Perkembangan suatu penyakit dalam akuakultur meliputi suatu interaksi yang

kompleks antara tingkat virulensi patogen, derajat imunitas insang, kondisi fisiologis dan genetik hewan, stress dan padat tebaran. Gangguan penyakit pada budidaya ikan merupakan resiko biologis yang harus selalu diantisipasi. Serangan penyakit pada ikan dapat timbul sewaktu waktu, bersifat eksplosif (meluas), penyebarannya cepat dan sering menimbulkan kematian. (Cahyono, 2000).

Tidak jarang apabila penyakit telah menjangkit ikan, petani sulit menentukan ienis penyakit yang menyerang ikan mereka sehingga petani pun kesulitan menentukan langkah yang harus diambil dalam menanggulangi penyakit itu. Terlebih lagi, banyak penyakit pada ikan yang memiliki gejala klinis yang mirip antar satu penyakit dengan penyakit lain sehingga metode laboratorium sering menjadi alternatif untuk mendiagnosa penyakit yang menyerang. Untuk itulah penting untuk melakukan identifikasi jenis-jenis patogen terutama bakteri pada ikan budidaya dengan berbagai metode yang tersedia. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri yang didapatkan dari ikan nila (Oreochromis niloticus) yang dibudidayakan di kabupaten Minahasa Utara. Penelitian ini dilaksanakan di bulan Oktober sampai dengan Desember 2019, Isolasi dan identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium

METODE PENELITIAN

Pengukuran Kualitas Air

Untuk kualitas air yang diukur antara lain adalah pH, suhu, oksigen terlarut (DO). Untuk pengukuran suhu dilakukan dengan thermometer infrared dengan menekan tombol yang ada pada alat thermometer infrared kemudian mengarkan ke air/area

lokasi budidaya sampai angka yang ada pada *thermometer infrared* berhenti kemudian dicatat/didokumentasikan.

Pembuatan Media Trypticase Soy Agar (TSA)

Untuk membuat media TSA di perlukan 40 gram media agar yang dilarutkan dengan 1000 mL akuades dalam tabung erlemayer, lalu dihomogenkan dengan magnetik stirer, sambil dipanaskan diatas hotplat sampai mendidih. Selanjutnya erlemayer ditutup dengan kapas dan alumunium foil untuk disterilisasi dengan autoclave dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian di dinginkan hingga suhu 6°C. Lalu dituangkan secara aseptik kedalam cawan petri steril dan ditutup rapat, setelah media membeku, cawan dibungkus dengan kertas padi dengan posisi terbalik. Apabila tidak langsung tidak langsung digunakan media dapat disimpan dalam refrigerator.

Pembuatan Media Motility

Untuk media motility diperlukan 30 gram media SIM yang dilarutkan dengan 1000 mL akuades dalam tabung elemayer, lalu dihomogenkan dengan magnetik stirer, sambil dipanaskan didalam hotplate sampai medidih. Selanjutnya erlemayer ditutup dengan kapas dan alumunium foil untuk disterilisasi dengan autoclave dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit. Apabila tidak langsung tidak langsung digunakan media dapat disimpan dalam refrigerator.

Pembuatan media O/F

Untuk media O/F diperlukan 11 g media agar yang dilarutkan dengan 1000 mL akuades dalam tabung elemayer, lalu dihomogenkan dengan magnetik stirer, sambil dipanaskan di dalam hotplate sampai mendidih. Selanjutnya erlemayer ditutup dengan kapas dan alumunium foil untuk disterilisasi dengan autoclave dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit. Apabila tidak langsung digunakan media dapat disimpan dalam refrigerator.

Inokulasi

Jarum ose yang sudah disterilkan dengan cara pemanasan di atas lampu bunsen ditusukan pada sampel insang demikian sama halnya dilakukan juga pada sampel ginjal bias langsung diinokulasikan pada bagian permukaan media penumbuh TSA (*Tryptone Soya Agar*), dengan cara menggoreskan (streak plate) kemudian diinkubasi pada suhu 25-28 °C selama 24 jam. Setelah itu diinokulasi duplikatif pada cawan petri yang berbeda dan selanjutnya digunakan untuk proses identifikasi.

Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri patogen berdasarkan identifikasi Bacterial Fish Pathogens (Cowan *et al.*, 2016) dilakukan melalui serangkaian pengamatan koloni dan morfologi bakteri melalui pengujian gram, dilanjutkan dengan uji biokimia melalui uji oksidase,uji katalase, uji motility dan uji Oksidatif Fermentatif (O/F).

Uji Biokimia

Pengujian Gram

Pengujian gram bertujuan untuk menentukan karakteristik bakteri pada mikroskop terlihat pada setiap galur uji, baik reaksinya terhadap pengujian gram, bentuk sel dan ukurannya. Tahap-tahap dalam penentuan Gram bakteri metode Hucker (Lay, 1994) adalah sebagai berikut:

Ambil koloni bakteri yang telah ditumbuhkan dan di suspensikan pada cairan media KOH 3% yang di sediakan pada preparat dengan menggunakan jarum ose dengan cara mencelupkan reagen yang telah diambil ke cairan media, apabila kelihatan berlendir maka bakteri gram negatif dan apabila tidak berarti bakteri gram positif.

Uji Oksidase

Uji oksidase berfungsi untuk menentukan ada tidaknya enzim oksidase pada bakteri Prosedur kerja dari uji oksidase (Lay, 1994) adalah sebagai berikut:

- Kertas saring ditetesi dengan larutan kovac.
- Setelah itu biakan bakteri pada kultur sediaan dioleskan pada kertas saring dengan menggunakan jarum ose.
- Pengamatan dilakukan apabila warna kertas saring yang digoreskan bakteri berubah warna menjadi ungu, hasil (+) hal ini berarti bakteri yang ada mempunyai enzim oksidase sebaliknya jika tidak tidak terjadi perubahan warna berarti bakteri yang ada tidak menghasilkan enzim oksidase atau hasil (-).

Uji katalase

Katalase adalah enzim yang mengkatalisasi penguraian hydrogen peroksida (H₂O₂). Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini dapat menginaktivasikan enzim dalam sel (Lay, 1994). Prosedur kerjanya yaitu: Larutan H₂O₃ 3% diteteskan pada objek glass, kemudian suspensikan koloni bakteri

dengan menggunakan jarum ose. Bila terjadi pembentukan gelembung pada objek glass. Bila terjadi pembentukan gelembung udara, maka uji bersifat positif dan apabila tidak terbentuk gelembung-gelembung udara maka uji bersifat negative.

Uji Motility

Tujuan dari uji motility adalah untuk mengetahui pergerakan bakteri, bila terjadi pergerakan atau tidak pada bakteri tersebut Cara kerja:

- Siapkan media SIM secukupnya
- Ambil koloni bakteri dengan menggunakan jarum ose dan tusukkan ke dalam media sampai tiga per empat media.
- Masukkan dalam inkubator dan inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.
- Hasil positif ditandai oleh adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar.

Uji Oksidatif Fermentasi (OF)

Tujuan dari uji O/F adalah untuk mengetahui apakah bakteri mampu memfermentasikan karbohidrat pada kondisi anaerob (Lay, 1994)

Cara kerja:

- Bakteri diambil dari media agar miring menggunakan ose lurus
- Dua medium O/F (dengan glukosa) pada tabung reaksi diinokulasi bakteri, dimana salah satu tabung ditutup paraffin cair steril.
- Dua medium O/F yang tidak diinokulasi juga diperlakukan sama seperti di atas sebagai kontrol negatif.
- Dua tabung medium O/F tanpa glukosa juga diinokulasi dan satu tabung ditutup dengan parffin cair steril
- Kemudian tabung-tabung tersebut diinkubasi selama 24 jam. Jika medium

yang ditutup paraffin berubah warna dari biru menjadi kuning, maka bakteri mampu memanfaatkan karbohidrat pada kondisi anaerob melalui proses fermentasi sehingga bakteri dikatakan bersifat fermentatif. Apabila perubahan warna menjadi kuning hanya pada media yang tidak ditutup paraffin cair maka bakteri hanya pada media mampu memanfaatkan karbohidrat pada kondisi aerob melalui proses oksidasi sehingga bakteri dikatakan bersifat oksidatif.

Analisis Data

Hasil uji biokimia bakteri patogen selanjutnya disesuaikan dengan buku identifikasi Manual for The Identification of Medical Bakteria (Cowan *et al.*, 2016). Data-data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengamatan gejala klinis yang dilakukan terhadap sampel ikan nila yang diambil dari desa Tatelu memiliki beberapa ciri sebagai berikut: terdapat luka pada bagian flamella insang, insang terlihat pucat, dan terdapat luka pada mata. Hasil identifikasi patogen terterah pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengamatan gejala klinis yang dilakukan terhadap sampel ikan nila yang diambil dari desa Warukapas memiliki beberapa ciri sebagai berikut: terdapat luka serta hemoragik pada bagian tubuh, insang terlihat pucat, dan ginjal terlihat pucat. Hasil identifikasi patogen pada ikan yang berasal dari desa Warukapas dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Bakteri patogen pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Desa Tatelu

Kode Sampel	Bentuk	P. Gram	Motil	Kat	Oks	O/F	Keterangan
Nila Insang TU 1	R	-	+	+	+	F	Plesiomonas sp
Nila Ginjal TU 1	R	-	+	+	+	F	Plesiomonas sp
Nila luka TU 1	R	-	+	+	+	F	Aeromonas sp
Nila luka TU 2	R	•	+	+	+	F	Aeromonas sp
Nila Insang TU 2	R	-	+	+	+	F	Plesiomonas sp
Nila Ginjal TU 2	R	-	+	+	+	F	Plesiomonas sp
Nila Insang TU 3	R	-	-	+	+	0	Flavobacterium sp

Tabel 2. Bakteri patogen pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Desa Warukapas

Kode Sampel	Bentuk	P. Gram	Motil	Kat	Oks	O/F	Keterangan
Nila Insang WS 1	R	-	-	+	+	0	Flavobacterium sp
Nila Ginjal WS 1	R	-	+	+	+	F	Enterobacter sp
Nila luka 1 WS 1	R	-	+	+	+	F	Aeromonas sp
Nila Insang WS 2	R	-	-	+	+	0	Flavobacterium sp
Nila Ginjal WS 2	R	-	+	+	+	F	Enterobacter sp
Nila Ginjal WS 3	R	-	+	+	+	F	Enterobacter sp
Nila Insang WS 3	R	-	-	+	+	0	Flavobacterium sp

Tabel 3. Bakteri patogen pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Desa Matungkas

Kode Sampel	Bentuk	P. Gram	Motil	Kat	Oks	O/F	Keterangan
Nila Insang MS 1	R	-	+	+	+	F	Plesiomonas sp
Nila Ginjal MS 1	R	-	+	+	+	F	Enterobacter sp
Nila Luka MS 1	R	-	+	+	+	F	Aeromonas sp
Nila Insang MS 2	R	-	+	+	+	F	Plesiomonas sp
Nila Ginjal MS 3	R	-	+	+	+	F	Enterobacter sp

Ket Tabel:

TU = Tatelu
WS = Warukapas
MS = Matungkas
P.Gram = Pengujian gram

Mot = Motil Kat = Katalase Oks = Oksidase

O/F = Oksidatif / Fermentatif

Berdasarkan hasil pengamatan gejala klinis yang dilakukan terhadap sampel ikan nila yang diambil dari desa matungkas memiliki beberapa ciri sebagai berikut: flamella terbuka, insang terlihat pucat, dan terdapat luka serta hemoragik. Hasil identifikasi patogen pada ikan yang berasal dari desa Matungkas dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil penelitian isolasi dan identifikasi bakteri yang dilakukan terhadap sampel ikan nila yang diuji berdasarkan pengambilan sampel dari organ insang, ginjal dan luka serta melalui uji morfologi dan biokimia yang selanjutnya dibandingkan dengan buku panduan Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (Barrow end Feltham, 1993) ditemukan beberapa jenis bakteri patogen. Dari keseluruhan isolat yang dianalisis, terdapat 4 isolat yang positif sp, 6 isolat yang positif Aeromonas Plesiomonas sp, 5 isolat yang positif bakteri Enterobacter sp dan 4 isolat yang positif flavobacter

Berdasarkan hasil pemeriksaan yang dilakukan pada isolat Nila luka TU 1, Nila luka TU 2, Nila luka 1 WS 1, Nila Luka MS 1 yang diisolasi dari luka yang terdapat pada ikan nila. Hasil uji lanjut telah dilakukan dengan menggolongkan ke 4 sampel tersebut ke dalam jenis *Aeromonas* sp. Hasil uji mendapatkan uji gram negatif, bentuk morfologi batang pendek, motility positif, katalase positif, oksidasi positif, dan hasil uji O/F bersifat fermentatif.

Aeromonas sp

Aeromonas sp adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek, beberapa spesies bersifat motil dan memiliki flagella

polar, sedangkan spesies lainnya bersifat non motil, tidak menghasilkan spora (Post, 1987). Bakteri ini menghasilkan oksidase katalase positif, positif, fermentasi karbohidrat terjadi melalui proses oksidasi dan menghasilkan gula (Cowan et al., 2016). Bakteri ini umumnya hidup di air tawar. Aeromonas sp. bisa muncul setiap saat terutama kondisi lingkungan jelek. Penularan bakteri Aeromonas sp. dapat berlangsung melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang tercemar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kordi dan Ghufran (2004)bahwa penularan Aeromonas sp. dapat berlangsung melalui peralatan yang tercemar dan ikan yang terinfeksi Aeromonas sp. gerakannya menjadi lebih lambat, lemah dan mudah ditangkap. Menurut Saragih dkk. (2015) serangan bakteri ini bersifat laten, jadi tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Serangan bakteri ini baru akan terlihat apabila sistem imun ikan menurun akibat ikan stres yang di sebabkan oleh penurunan kualitas air. Bakteri ini ditemukan pada ikan nila yang menunjukkan gejala klinis antara lain terdapat luka pada kulit.

Flavobacterium sp

Menurut Bernardet *et al.* (1996) genus *Flavobacterium* merupakan bakteri dapat diisolasi dari sejumlah beragam habitat seperti tanah, air, lumpur, tanaman, produk makanan seperti ikan, daging, unggas, susu atau minuman asam laktat. Genus *Flavobacterium* merupakan bakteri yang masuk dalam gram-negatif menghasilkan pigmen kuning, membentuk non--endospora, kebutuhan terhadap oksigen termasuk aerob, bersifat non motil.

Flavobacterium termasuk famili Achromobacteriaceae merupakan bakteri patogen oportunistik. Diameter koloni mulai dari 0,2-2 µm, koloni berwarna kuning tua, habitat pada tanah dan air. Bentuk selnya berupa batang, memiliki ciri – ciri pendek, gram negatif dengan bentuk batang yang bergerak menghasilkan pigmen kuning, merah atau orange, pengurai protein. Termasuk dalam gram negatif. oksigen termasuk Kebutuhan terhadap aerob, bersifat non motil, oksidasi positif dan katalase positif (Jaelani, 2014).

Enterobacter sp

Enterobacter merupakan sp. bakteri gram negatif, bersifat fakultatif anaerobik, berbentuk batang dan bisa bergerak (motil), alat gerak tersebut berupa flagella peritrik yaitu flagela yang merata tersebar di seluruh secara permukaan sel (Pelczar and Chan, 1986). Mohapatra et al. (2003) mengungkapkan bahwa bakteri Enterobacter sp juga merupakan penghasil enzim protease, amilase dan selulase. Selain itu, Muchlis (2013)berpendapat bahwa bakteri Enterobacter sp. juga memiliki aktivitas antibakteri. Namun, bakteri Enterobacter sp. juga memiliki faktor-faktor patogenitas antara lain endotoksin dan enterotoksin seperti yang diungkapkan oleh Karsinah dkk. (1994)Bakteri patogen dapat menyebabkan penyakit apabila memiliki kemampuan untuk merusak jaringan (invasiveness) dan menghasilkan toksin (toxigenesis) (Todar, 2002).

Plesiomonas sp

Plesiomonas sp merupakan bakteri anaerob fakultatif, Gram negatif, berbentuk batang, oksidase positif, non spora, motil dan memiliki lophotrichous dan peritrichous flagela, tumbuh pada suhu optimum 30 ° C dan memiliki kisaran 29-41°C (Hudson, 2005). Plesiomonas sp merupakan bakteri patogen oportunistik, dapat menyebabkan terjadinya petechial haemorrhagic pada usus ikan (Buller, 2004). Pada kondisi normal, bakteri ini dapat ditemukan pada saluran gastro-intestinal ikan air tawar (Hudson, 2005).

KESIMPULAN

- Berdasarkan hasil identifikasi, bakteri Aeromonas sp ditemukan pada 4 isolat yang diidentifikasi pada ikan nila, Plesiomonas sp ditemukan pada 6 isolat yang diidentifikasi pada ikan nila, bakteri Flavobacterium sp ditemukan pada 4 isolat yang diidentifikasi pada ikan nila dan bakteri *Enterobacteria* sp ditemukan pada 5 isolat yang diidentifikasi pada ikan nila di budidayakan di Kecamatan Dimembe Kabupaten Minahasa Utara pada tahun 2019.
- Berdasarkan hasil pengujian dari penelitian ini terlihat bahwa bakteri yang menginfeksi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Kecamatan Dimember Kabupaten Minahasa Utara pada tahun 2019 yang ditemukan dalam penelitian ini didapat 4 jenis bakteri yang menyerang ikan nila yaitu *Aeromonas* sp, *Plesiomonas* sp, *Flavobacterium* sp dan *Enterobacter* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashari C, Tumbol RA, Kolopita MEF. 2014.
 Diagnosa Penyakit Bakterial pada Ikan Nila (*Oreocrhomis niloticus*) yang Dibudidaya pada Jaring Tancap di Danau Tondano. Jurnal Budidaya Perairan 2 (3): 24 30.
- Barrow GI, Feltham RKA. 1993. Cowan and Steel Manual for the Identification of Medical Bacteria. New York: Cambridge University Press.
- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vand.amme P 1996. Cutting a Gordlan knot. Classification Emended and Description of The Genus Flavobacterium, Emended Description the Family of Flavobacteri- aceae, and proposal of Flavobacterium Hydatis Nom. nov. (basonym, Cytophaga aquafilis Strohl and Tait 1978). Int J Syst Baclenol 46:128-14
- Buller NB. 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. CABI Publishing. Oxford, UK. 394 p.
- Cahyono B. 2000. Budidaya Ikan Air Tawar. Kanisius. Yogyakarta
- Cowan N, Hardman K, Saults JS, Blume CL, Clark KM, Sunday MA. 2016. Detection of the number of change s in a display in working memory. Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition, 42, 169–185.
- Hudson E. 2005. Survey of Specific Fish Pathogens in Free-Ranging Fish from Devils Lake, North Dakota. Bozeman Fish Health Center Technical Report 05-2.
- Jaelani I. 2014. Bakteri Asosiasi Pada Karang Pachyseris sp. yang Terinfeksi Penyakit BBD (Black Band Disease) di Perairan Pulau Barrang Lompo. Skripsi FIKP. Makassar.

- Karsinah, Lucky HM, Suharto, Mardiastuti HM. 1994. Batang Negatif Gram dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran, 163, Bina Aksara, Jakarta.
- Lay B. 1994. Analisa mikrobiologi di Laboratorium. Raja Grafindo persada. Jakarta.
- Mohapatra BR, Bapuji M, Sree A. 2003.
 Production of Industrial Enzymes
 (Amylase, Carboxymethylcellulase
 And Protease) by Bacteria Isolated
 From Marine Sedentary Organisms.
 Acta Biotechnologica, 23 (1): 75-84.
- Muchlis ARF. 2013. Skrining Bakteri Simbion Spons Asal Perairan Pulau Polewali Dan Pulau Sarappolompo Penghasil Antibakteri Sebagai Terhadap Bakteri Patogen Pada Manusia Ikan. Dan Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar. 69 hal.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1986. Penterjemah, Ratna Siri Hadioetomo dkk. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1, Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Saragih AA, Syawal H, Lukistyowati I. 2015. Identifikasi Bakteri Patogen Pada Ikan Selais (Ompok hypoptalmus) Yang Tertangkap di Sungai Kampar Desa Teratak Buluh Provinsi Riau. Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Perikanan dan Ilmu Kelautan Vol 2
- Todar K. 2002. Mechanisms of Bacterial Patogenicity: endotoxins. Universitas of Winconsin. New York.
- Post G. 1987. Textbook of Fish Health. TFH. Publication inc. New York
- Wolke RE. 1975. Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish dalam The pathology of fishes. Edited by W.E. Ribelin and G. Migaki. The University of Wisconsin Press.