

PENGARUH FIKSASI FORMALIN TERHADAP KUALITAS JARINGAN DAN HASIL IMUNOHISTOKIMIA: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW

Fitri Claudia Agathis Mahundingan¹, Rut Madalin Banobe²

01091240028@student.uph.edu¹, 01091240014@student.uph.edu²

Universitas Pelita Harapan

ABSTRAK

Fiksasi formalin merupakan tahap pra-analitik yang sangat penting dalam pemrosesan jaringan histopatologi karena berperan dalam mempertahankan morfologi jaringan dan keberhasilan pemeriksaan imunohistokimia (IHC). Namun, variasi waktu penundaan sebelum fiksasi, durasi fiksasi, dan konsentrasi formalin dapat memengaruhi kualitas jaringan serta ekspresi antigen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh fiksasi formalin terhadap kualitas jaringan dan hasil pewarnaan imunohistokimia melalui metode Systematic Literature Review (SLR). Literatur diperoleh dari basis data Google Scholar, PubMed, PLOS, MDPI, PMC, dan Oxford Academic dengan kriteria artikel ilmiah yang dipublikasikan pada tahun 2018–2026. Hasil kajian menunjukkan bahwa fiksasi yang terlalu singkat menyebabkan autolisis jaringan, sedangkan fiksasi berkepanjangan, terutama melebihi 96 jam, meningkatkan risiko terbentuknya artefak dan penurunan reaktivitas antigen. Pengaruh tersebut bervariasi bergantung pada jenis jaringan, antigen, dan protokol laboratorium yang digunakan. Selain itu, metode bebas formalin seperti Non-Formalin Paraffin Embedded (NFPE) menunjukkan kualitas histomorfologi dan pewarnaan yang sebanding dengan metode Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) pada sebagian besar parameter yang dievaluasi. Dengan demikian, standarisasi kondisi fiksasi formalin sangat diperlukan untuk menjaga kualitas diagnostik, sementara metode bebas formalin berpotensi menjadi alternatif yang menjanjikan setelah melalui validasi lebih lanjut.

Kata Kunci: Fiksasi Formalin, Imunohistokimia, Kualitas Jaringan, Histopatologi, Systematic Literature Review.

ABSTRACT

Formalin fixation is a critical pre-analytical step in histopathological tissue processing because it preserves tissue morphology and supports accurate immunohistochemical (IHC) staining. However, variations in cold ischemia time, fixation duration, and formalin concentration may affect tissue quality and antigen expression. This study aimed to analyze the effects of formalin fixation on tissue quality and immunohistochemical staining outcomes using a Systematic Literature Review (SLR) approach. Relevant studies published between 2018 and 2026 were retrieved from Google Scholar, PubMed, PLOS, MDPI, PMC, and Oxford Academic. The review demonstrated that inadequate fixation leads to tissue autolysis, whereas prolonged fixation, particularly beyond 96 hours, increases the risk of fixation artifacts and reduced antigen immunoreactivity. These effects vary depending on tissue type, antigen characteristics, and laboratory protocols. Furthermore, Non-Formalin Paraffin Embedded (NFPE) techniques have demonstrated histomorphological preservation and staining quality comparable to conventional Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) methods for most evaluated parameters. Therefore, standardization of formalin fixation conditions is essential to ensure reliable diagnostic quality, while formalin-free tissue processing represents a promising alternative that requires further validation before widespread clinical implementation.

Keywords: Formalin Fixation, Immunohistochemistry, Tissue Quality, Histopathology, Systematic Literature Review.

INTRODUCTION

Fiksasi jaringan menggunakan formalin (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded atau FFPE) hingga saat ini masih menjadi standar emas (gold standard) dalam bidang patologi anatomi. Proses ini sangat krusial untuk mencegah autolisis dan degradasi jaringan, serta mempertahankan kualitas histomorfologi dan detail seluler agar menyerupai kondisi *in vivo* (Winter et al., 2024). Meskipun formalin merupakan bahan fiksatif yang paling luas digunakan karena kemampuannya dalam menstabilkan protein melalui ikatan silang (cross-linking), kelestarian morfologi dan kualitas pewarnaan jaringan sangat bergantung pada variabel pra-analitik di laboratorium (Bauer et al., 2021). Ketidaktepatan dalam proses fiksasi tidak hanya merusak arsitektur jaringan secara fisik, tetapi juga dapat memicu hasil negatif palsu atau positif palsu pada uji lanjutan.

Masalah utama yang sering menjadi kendala klinis adalah tidak seragamnya perlakuan pra-analitik, terutama yang berkaitan dengan penundaan fiksasi (cold ischemia time) dan durasi jaringan terendam dalam formalin. Penundaan masuknya spesimen jaringan ke dalam cairan fiksatif terbukti memberikan dampak degeneratif terhadap integritas kelestarian molekul biomarker, seperti yang sering menjadi bias pada evaluasi molekuler kanker payudara (Khoury, 2018). Selain waktu iskemik, durasi fiksasi yang tidak tepat, baik itu terlalu singkat (under-fixation) maupun terlalu lama (prolonged fixation), secara signifikan dapat menurunkan kualitas dan mengubah hasil evaluasi pewarnaan imunohistokimia (IHC) pada spesimen reseksi karsinoma paru (van Seijen et al., 2019). Kondisi durasi dan paparan fiksatif ini secara langsung memengaruhi intensitas dan spesifisitas pengikatan serta ekspresi antibodi pada prosedur IHC (Taha et al., 2024). Meskipun saat ini telah ada studi mengenai alternatif fiksatif bebas formalin yang dapat menghasilkan kualitas histokimia dan imunohistokimia bermutu tinggi (Niemantsverdriet et al., 2024), formalin tetap menjadi pilihan utama secara global sehingga pemahaman batasan fiksasinya sangat dibutuhkan.

Berbagai penelitian independen telah membahas variabel fiksasi, namun belum banyak tinjauan yang secara spesifik merangkum interaksi variabel pra-analitik tersebut dalam satu dekade terakhir. Oleh karena itu, penelitian Systematic Literature Review ini bertujuan untuk menganalisis dan menyintesis bukti-bukti literatur terbaru mengenai pengaruh fiksasi formalin, khususnya berfokus pada waktu penundaan dan durasi fiksasi, terhadap kualitas jaringan dan hasil akhir pewarnaan imunohistokimia.

RESEARCH METHODS

Penelitian ini mengevaluasi pengaruh fiksasi formalin terhadap kualitas jaringan dan hasil pewarnaan imunohistokimia menggunakan metode tinjauan literatur sistematis.

Subjek dan Material Penelitian: Subjek dalam penelitian ini adalah data sekunder berupa artikel ilmiah berbasis penelaahan sejawat (peer-reviewed) yang diterbitkan antara tahun 2018 hingga 2026. Material utama yang dievaluasi mencakup enam literatur spesifik yang meneliti faktor pra-analitik jaringan: Taha et al. (2024), Niemantsverdriet et al. (2024), Winter et al. (2024), Bauer et al. (2021), van Seijen et al. (2019), dan Khoury (2018).

Alat yang Digunakan: Alat utama yang digunakan mencakup basis data akademis elektronik (Google Scholar, PubMed, PLOS, MDPI, PMC, dan Oxford Academic) untuk pencarian literatur, serta perangkat lunak manajemen referensi untuk mengorganisasi dan menyeleksi artikel.

Desain Penelitian: Penelitian ini menggunakan desain Systematic Literature Review (SLR).

Teknik Pengambilan Sampel: Pemilihan literatur dilakukan menggunakan teknik purposive sampling. Kriteria inklusi difokuskan pada artikel yang secara spesifik menguji

dampak kondisi fiksasi (seperti konsentrasi formalin, durasi fiksasi, dan alternatif fiksatif) terhadap morfologi jaringan dan hasil ekspresi penanda imunohistokimia.

Variabel yang Diukur: Variabel Independen: Metode dan mekanisme fiksasi, yang mencakup lama waktu fiksasi, waktu tunggu sebelum fiksasi (cold ischemia time), konsentrasi fiksatif (contohnya 10% Neutral Buffered Formalin), dan penggunaan fiksatif bebas formalin/xylene. Variabel Dependen: Kualitas histomorfologi jaringan serta intensitas dan sensitivitas ekspresi antibodi pada pewarnaan imunohistokimia (seperti penanda ER, PR, HER2, dan Ki67).

Teknik Pengambilan Data: Pengumpulan data dilakukan melalui penelusuran sistematis menggunakan kata kunci spesifik, diantaranya mencakup "Immunohistochemistry", "Fixation", "Formalin", dan "Immunohistochemical markers". Literatur yang terkumpul kemudian disaring mulai dari judul, abstrak, hingga pembacaan teks penuh untuk mengekstraksi data relevan terkait asal sampel, lokasi jaringan, mekanisme fiksasi, dan hasil akhir penelitian.

Analisis Data dan Model Statistik: Data dianalisis menggunakan metode sintesis naratif deskriptif kualitatif. Data yang diekstraksi dari setiap literatur ditabulasi dan dibandingkan guna mengidentifikasi pola pengaruh variabel pra-analitik terhadap hasil akhir uji imunohistokimia. Penelitian ini tidak menggunakan pemodelan rumus statistik secara matematis, melainkan mensintesis temuan empiris dari literatur yang telah divalidasi.

RESULTS AND DISCUSSUON

Penelusuran terhadap literatur yang relevan menunjukkan bahwa terdapat tiga artikel secara langsung membahas mengenai topik fiksasi formalin terhadap kualitas jaringan dan hasil imunohistokimia (IHC): Taha et al. (2024), el Moutaoukkil et al. (2026), Niemantsverdriet et al. (2026). Ketiga artikel inilah yang menjadi dasar seluruh analisis kuantitatif dan pembahasan dalam kajian ini.

Tabel 1. Ringkasan Studi yang Relevan dengan Topik Fiksasi Formalin

Penulis (Tahun)	Desain & Sampel	Variabel Fiksasi	Temuan Kunci
Taha et al. (2024)	Systematic review, 15 artikel primer (1986-2022)	Durasi & konsentrasi formalin	Efek fiksasi terhadap ekspresi ER, PR, HER2, Ki67, CK, CD, P63, S100 bervariasi tergantung jenis jaringan & antigen.
el Moutaoukkil et al. (2026)	Eksperimental, 72 spesimen kanker digestif (tumor & normal)	FT: 24, 48, 96 jam, 7 hari.	Fiksasi >96 jam menurunkan skor morfologi tumor (p=0,023) dan normal (p=0,005).
Niemantsverdriet et al. (2026)	Eksperimental validasi, 16 jenis jaringan manusia	FFPE (formalin) vs NFPE (bebas formalin)	92% (45/49) pewarnaan histokimia & IHC tetap baik tanpa formalin sama sekali.

Source: Taha et al. (2024), el Moutaoukkil et al. (2026), Niemantsverdriet et al. (2026)

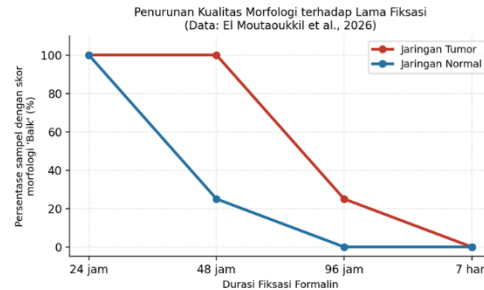
Tabel 2. Distribusi Skor Morfologi Berdasarkan Durasi Fiksasi (el Moutaoukkil et al., 2026)

Gambar 1. Tren Penurunan Persentase Morfologi "Baik" terhadap Durasi Fiksasi

Durasi fiksasi	Tumor – Baik (%)	Tumor – Cukup (%)	Tumor – Buruk (%)	Normal – Baik (%)	Normal – Cukup (%)	Normal – Buruk (%)
24 jam	100	0	0	100	0	0

48 jam	100	0	0	25	75	0
96 jam	25	75	0	0	100	0
7 hari	0	75	25	0	50	50

Gambar 1. Tren Penurunan Persentase Morfologi "Baik" terhadap Durasi Fiksasi



Data pada Tabel 2 dan Gambar 1 menegaskan pola yang konsisten: kualitas morfologi jaringan tumor maupun normal menurun seiring bertambahnya durasi fiksasi, dengan penurunan paling tajam terjadi setelah 48-96 jam. Jaringan normal tampak mengalami penurunan lebih awal dibanding tumor pada rentang 48 jam, namun pada durasi maksimal (7 hari) kedua jenis jaringan sama-sama berada pada kategori buruk/cukup.

Tabel 3. Contoh Pengaruh Durasi/Konsentrasi Fiksasi terhadap Ekspresi Marker IHC

Marker	Jenis Jaringan	Mekanisme Fiksasi	Hasil
ER,PR,HER2	Kanker payudara (manusia)	Fiksasi >72 jam	Tidak menurunkan ekspresi ER/PR/HER2 secara signifikan pada satu studi
ER, PR	Kanker payudara (manusia)	Fiksasi 8-16 hari	Penurunan imunoreaktivitas
MCK, SMA	Hati, kolon, uterus (manusia)	1% formaldehida 24 jam vs 4-5% 48 jam	Konsentrasi rendah + durasi singkat memberi pewarnaan lebih baik
HER2/neu	Kanker lambung (manusia)	10% NBF 24 jam vs 20% formalin tak-terbuffer	NBF 10% memberi pewarnaan tertinggi
CD antigens	Jaringan limfoid (manusia)	4-10% NBF, 24-48 jam vs 20% selama 5 hari	Fiksasi 20% selama 5 hari menurunkan imunoreaktivitas.

Ketiga artikel inti yang direview menunjukkan bahwa fiksasi formalin memiliki pengaruh yang nyata namun tidak seragam terhadap kualitas jaringan dan hasil pewarnaan imunohistokimia. Pengaruh tersebut sangat bergantung pada durasi, konsentrasi, jenis jaringan, serta jenis antigen yang diperiksa. Temuan el Moutaoukkil et al. (2026) memberikan bukti kuantitatif bahwa fiksasi yang terlalu singkat maupun terlalu lama sama-sama merugikan: fiksasi yang tidak adekuat gagal menghentikan proses autolisis, sementara fiksasi yang berkepanjangan (di atas 96 jam, terlebih hingga 7 hari) menimbulkan artefak berupa nuclear smudging dan vakuolisasi sitoplasma yang mengaburkan detail penting. Hal ini sejalan dengan prinsip yang disintesis Taha et al. (2024), bahwa formaldehida bekerja melalui pembentukan ikatan silang (crosslink) antara protein maupun antara protein dan asam nukleat, sehingga durasi fiksasi yang optimal sesungguhnya merupakan titik keseimbangan antara preservasi struktur dan penutupan (masking) epitop yang dibutuhkan untuk pengikatan antibodi pada pemeriksaan IHC.

Variabilitas hasil antar-studi yang dirangkum dalam systematic review Taha et al. (2024) juga mengindikasikan bahwa efek fiksasi terhadap ekspresi marker IHC tidak dapat digeneralisasi secara tunggal, melainkan bergantung pada jenis antigen (nuklear cenderung

lebih rentan dibanding sitoplasmik), jenis jaringan dan asal organ, klon antibodi yang digunakan, serta protokol pengambilan kembali antigen (antigen retrieval) yang diterapkan di masing-masing laboratorium. Perbedaan hasil antar studi primer yang direview kemungkinan besar mencerminkan perbedaan protokol teknis dan bukan semata perbedaan biologis jaringan, sehingga rekomendasi mengenai “ambang aman” durasi fiksasi perlu dipahami sebagai estimasi kontekstual, bukan angka mutlak yang berlaku universal.

Temuan yang tidak kalah penting yaitu munculnya bukti bahwa kualitas jaringan dan hasil IHC yang setara dengan FFPE ternyata dapat dicapai tanpa penggunaan formalin sama sekali, sebagaimana ditunjukkan Niemantsverdriet et al. (2026) melalui teknik NFPE (Non-Fixed Paraffin Embedded) berbasis CO₂ superkritis. Fakta bahwa 92% dari total pewarnaan histokimia dan IHC yang diuji tetap memberikan hasil baik atau bahkan lebih baik dibanding FFPE konvensional yang menunjukkan bahwa peran formalin selama ini mungkin tidak sepenuhnya esensial untuk preservasi morfologi dan reaktivitas antigen, melainkan lebih merupakan konsekuensi historis dari ketiadaan alternatif yang setara. Namun demikian, kegagalan pada tiga marker IHC penting seperti PAX-8 menunjukkan bahwa validasi antibodi spesifik-metode tetap diperlukan sebelum metode bebas-formalin dapat diadopsi secara luas dalam praktik diagnostik rutin (Niemantsverdriet et al., 2026).

Secara keseluruhan, ketiga studi ini saling melengkapi dan memperkuat satu kesimpulan yang konsisten: fiksasi formalin memang berperan penting dalam menentukan kualitas morfologi jaringan dan keberhasilan deteksi antigen pada imunohistokimia, namun efeknya bersifat dose- dan time-dependent serta sangat bergantung pada konteks jaringan dan marker yang diperiksa, bukan merupakan hubungan yang linear atau seragam.

CONCLUSION

Berdasarkan kajian terhadap literatur yang relevan, dapat disimpulkan bahwa durasi dan konsentrasi fiksasi formalin memiliki pengaruh signifikan terhadap kualitas morfologi jaringan maupun hasil pewarnaan imunohistokimia, dengan fiksasi yang terlalu singkat menyebabkan autolisis dan fiksasi yang berkepanjangan menyebabkan artefak berupa penutupan epitop dan degradasi struktur seluler. Pengaruh ini bervariasi tergantung jenis jaringan, jenis antigen, serta protokol teknis yang digunakan, sehingga standarisasi waktu dan konsentrasi fiksasi – idealnya menggunakan Neutral Buffered Formalin 10% dengan durasi tidak melebihi 96 jam – menjadi kunci untuk menjaga validitas hasil diagnostik. Perkembangan metode alternatif bebas-formalin seperti NFPE menunjukkan hasil yang menjanjikan dan setara dengan FFPE pada mayoritas parameter yang diuji, mengindikasikan bahwa optimalisasi pra-analitik di masa depan tidak lagi harus bergantung sepenuhnya pada formaldehida, meskipun validasi lebih lanjut pada marker-maker spesifik masih diperlukan sebelum penerapan klinis yang luas dapat direkomendasikan.

REFERENCES

- Bauer, D. R., et al. (2021). Making a science out of preanalytics: An analytical method to determine optimal tissue fixation in real-time. *PLOS ONE*.
- Cummings, M., King, H., Hurst, J., Tanner, G., Khazin, L., Thompson, P., Gray, A., Gahir, N., Cartledge, C., Farooq, Z., Raveendran, K., Allen, K., Rotimi, O., & Orsi, N. M. (2020). Decreasing formalin concentration improves quality of DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens without compromising tissue morphology or immunohistochemical staining. *Journal of Clinical Pathology*, 73(8), 514–518.
- el Moutaoukkil, L., Chbani, L., Toughrai, I., & Benjelloun, B. (2026). Pre-Analytical Variables in Digestive Cancer Pathology: A Systematic Assessment of Morphological Preservation in Tumoral and Normal Tissues. *Diagnostics*, 16(3), 445.

- High-quality histochemistry, immunohistochemistry, and immunofluorescence on xylene- and formalin-free paraffin-embedded tissues. (2023). PLOS ONE.
- Khoury, T. (2018). Delay to formalin fixation (cold ischemia time) effect on breast cancer molecules. American Journal of Clinical Pathology.
- Niemantsverdriet, M., Eshuis, A. M., van der Horst, N., Ogink, R., van Smeerdijk, P., van der Starre-Gaal, J., & Hoogland, A. M. (2026). High-quality histochemistry, immunohistochemistry, and immunofluorescence on xylene- and formalin-free paraffin-embedded tissues. PLOS One, 21(2), e0340480.
- Taha, I. A., Ban Fadhil AL-Drobie, & Alghanim, K. M. (2024). The Role Of Fixation On Antibodies Expression In Immunohistochemical Staining. Deleted Journal, 3(1).
- van Seijen, M., et al. (2019). Impact of delayed and prolonged fixation on the evaluation of immunohistochemical staining on lung carcinoma resection specimens. Histopathology.
- Winter, L., et al. (2024). Comparative analysis of histomorphological quality and quantitative cell assessment in formalin-fixed paraffin-embedded and fresh frozen porcine skin biopsies. Methods and Protocols.