

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nyeri neuropatik kronis merupakan masalah kesehatan yang banyak ditemui dan dapat menimbulkan dampak fungsional serta psikologis yang signifikan bagi penderitanya. Nyeri neuropatik masih merupakan kondisi klinis yang menantang, yang sering menunjukkan respons yang kurang optimal terhadap terapi farmakologis maupun intervensional konvensional. Dalam beberapa tahun terakhir, injeksi dekstrosa, terutama dalam bentuk proloterapi perineural, telah muncul sebagai salah satu modalitas terapi alternatif yang potensial. Namun demikian, meskipun minat klinis terus meningkat, dasar bukti yang tersedia masih bersifat heterogen terkait konsentrasi dekstrosa, indikasi klinis, serta protokol prosedur yang digunakan.

Proloterapi adalah terapi yang melibatkan penyuntikan larutan iritan (biasanya berupa dekstrosa atau platelet rich plasma) ke dalam jaringan yang mengalami cedera atau nyeri kronis untuk merangsang proses penyembuhan alami tubuh, meningkatkan proliferasi sel-sel dan pembentukan jaringan ikat baru. Terapi ini banyak digunakan untuk kondisi muskuloskeletal, seperti nyeri punggung bawah, sendi, epicondylitis, dan ligamen yang lemah atau cedera.

Dekstrosa merupakan agen yang paling umum digunakan dalam proloterapi karena sifat hiperosmolarnya yang mampu menstimulasi respon peradangan ringan lokal. Respon ini diyakini memicu aktivasi fibroblas, sekresi faktor pertumbuhan, dan produksi matriks ekstraseluler seperti kolagen, yang penting dalam perbaikan jaringan ikat dan pengurangan nyeri kronis. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa proloterapi dekstrosa efektif dalam mengurangi nyeri dan memperbaiki fungsi pada kondisi seperti nyeri punggung bawah kronis, osteoarthritis, dan tendinopati.

Konsentrasi dekstrosa yang digunakan dalam proloterapi sangat bervariasi, biasanya antara 5% hingga 25%, dan pemilihannya sangat memengaruhi keseimbangan antara efek stimulasi regeneratif dengan risiko sitotoksitas (Topol et al., 2016). Konsentrasi rendah, seperti 5%, dilaporkan memiliki efek osmotik ringan yang dapat meningkatkan metabolisme sel tanpa menimbulkan kerusakan signifikan (Reeves & Hassanein, 2003). Konsentrasi 10% merupakan salah satu yang paling sering digunakan secara klinis karena terbukti cukup untuk merangsang aktivasi fibroblas dan memicu deposisi kolagen, namun masih dalam rentang yang

aman bagi sebagian besar sel jaringan (Rabago et al., 2016). Sementara itu, konsentrasi 12.5% mulai mendekati batas yang dilaporkan mampu meningkatkan respons inflamasi dan regeneratif yang lebih kuat, tetapi juga memiliki risiko sitotoksitas yang lebih tinggi terutama pada sel saraf yang lebih sensitif dibandingkan fibroblas atau sel otot (Lyftogt, 2007). Oleh karena itu, pemilihan konsentrasi yang optimal menjadi aspek penting dalam menjamin efektivitas dan keamanan terapi. Perbedaan konsentrasi ini juga dapat memengaruhi tingkat respons inflamasi, kenyamanan pasien, serta durasi dan efektivitas terapi.

Meskipun berbagai studi telah mendukung efektivitas proloterapi dekstrosa, belum terdapat konsensus mengenai konsentrasi dekstrosa yang paling optimal, terutama terkait efek biologisnya terhadap sel target pada tingkat molekuler dan fungsional. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dekstrosa dapat menurunkan viabilitas berbagai jenis sel fibroblas, namun pada konsentrasi yang tepat dekstrosa justru dapat meningkatkan ekspresi protein penyembuhan seperti kolagen dan merangsang jalur sinyal seperti MAPK/ERK yang terlibat dalam regenerasi jaringan. Dalam konteks regenerasi jaringan, sel fibroblas memegang peran sentral karena terlibat dalam migrasi, proliferasi, dan sintesis komponen matriks seperti kolagen tipe I dan α -smooth muscle actin (α -SMA), yang menunjukkan transdiferensiasi ke fenotipe miofibroblas. Aktivasi jalur pensinyalan seperti extracellular signal-regulated kinase (Erk) juga diketahui berperan dalam regulasi fungsi- fungsi ini. Pada penelitian ini, β III-tubulin dipilih sebagai penanda diferensiasi neuronal, sedangkan p-ERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase) digunakan sebagai indikator aktivasi jalur pensinyalan regenerasi.

PC12 adalah lini sel turunan pheochromocytoma dari kelenjar adrenal tikus. Sel ini unik karena dapat berdiferensiasi menjadi neuron mirip-simpatis ketika distimulasi oleh *nerve growth factor* (NGF). Sejak pertama kali dilaporkan oleh Greene & Tischler (1976), PC12 menjadi salah satu model paling banyak digunakan dalam penelitian neurobiologi, khususnya terkait regenerasi saraf, neurotoksisitas, dan mekanisme pensinyalan seluler. Penggunaan PC12 dalam penelitian regenerasi dapat menggambarkan model regenerasi saraf, relevan untuk mengevaluasi efek dekstrosa terhadap sistem saraf yang sering terlibat dalam nyeri neuropatik.

Pada penelitian ini dipilih empat konsentrasi yaitu 1%, 5%, 10%, dan 12,5% untuk dibandingkan efeknya terhadap sel PC12 yang merepresentasikan model sel saraf. Konsentrasi 5% dipilih karena merupakan konsentrasi rendah yang bersifat hampir isotonik dan relatif aman bagi viabilitas sel. Walaupun potensinya untuk menstimulasi respons inflamasi terbatas, konsentrasi ini sering digunakan sebagai kontrol aktif dalam studi proloterapi (Reeves &

Hassanein, 2003). Konsentrasi 10% dipilih karena merupakan konsentrasi yang paling sering digunakan dalam praktik klinis, terbukti cukup untuk menstimulasi aktivitas fibroblas dan deposisi kolagen tanpa menimbulkan sitotoksitas yang signifikan (Rabago et al., 2016). Sementara itu, konsentrasi 12,5% dipilih karena mulai mendekati batas tengah konsentrasi proloterapi yang dilaporkan memberikan stimulasi regeneratif lebih kuat dibandingkan 10%, namun pada saat yang sama memiliki risiko sitotoksitas yang lebih tinggi terutama pada sel saraf yang lebih sensitif (Lyftogt, 2007). Penelitian oleh Karasimav et al. (2023) menggunakan model sel neuroblastoma manusia (SH-SY5Y) untuk menyimulasikan respons sel saraf terhadap konsentrasi dekstrosa yang umum digunakan secara klinis. Studi ini menemukan efek toksisitas akut dan bergantung konsentrasi: viabilitas sel turun drastis menjadi 22,22 % pada 5 % dextrose dan 0 % pada 15 % dextrose setelah 6 jam paparan (perbandingan dengan kontrol 100 %). Temuan ini menegaskan bahwa sel saraf sangat sensitif dan memperkuat pentingnya memilih konsentrasi dekstrosa yang tidak hanya efektif tetapi juga aman. Dengan membandingkan ketiga konsentrasi tersebut, penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan hubungan dosis-respons dekstrosa terhadap sel PC12, serta memberikan dasar ilmiah bagi penentuan konsentrasi yang optimal dalam aplikasi proloterapi pada kondisi nyeri neuropatik.

Studi terhadap sel neuron (*PC12*) secara *in vitro* diperlukan untuk mengetahui efek spesifik dari dekstrosa pada jaringan target yang umum terlibat dalam cedera neuron dan nyeri neuropatik. Viabilitas sel dianalisis menggunakan trypan blue exclusion assay dan MTT assay, sedangkan aktivitas migrasi sel diukur melalui *migration assay*. Ekspresi gen β III-tubulin serta aktivasi jalur Erk dinilai menggunakan Elisa. Dengan membandingkan efek dua konsentrasi dekstrosa yang lazim digunakan (10% dan 15%) terhadap viabilitas, proliferasi, migrasi, serta ekspresi protein regeneratif, penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah terhadap pemilihan konsentrasi dekstrosa yang efektif dan aman untuk diaplikasikan dalam praktik proloterapi, khususnya dalam memodulasi aktivitas fibroblas yang berperan dalam penyembuhan jaringan muskuloskeletal. Pengetahuan ini diharapkan dapat memberikan pedoman yang lebih terstandarisasi bagi praktisi medis, meningkatkan efektivitas terapi, dan meminimalkan risiko serta ketidaknyamanan pada pasien.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- a. Apakah terdapat perbedaan viabilitas sel *PC12* setelah perlakuan dekstrosa 1 %, 5%, 10% dan 12,5%?

- b. Apakah terdapat perbedaan tingkat proliferasi dan migrasi antara sel yang diberi dekstrosa 1%, 5%, 10% dan 12,5%?
- c. Apakah pemberian dekstrosa 1%, 5%, 10%, dan 12,5 pada sel PC12 menunjukkan perbedaan dalam memicu ekspresi protein regeneratif seperti β III-tubulin, dan p-ERK?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui perbedaan efek konsentrasi dekstrosa 1%, 5%, 10%, dan 12,5% terhadap viabilitas, proliferasi, migrasi, serta ekspresi protein β III-tubulin dan p-ERK pada sel PC12 in vitro.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

- a. Menganalisis viabilitas sel PC12 pada perlakuan dekstrosa 1%, 5%, 10%, dan 12,5%.
- b. Menganalisis kemampuan proliferasi dan migrasi sel PC12 setelah paparan dekstrosa.
- c. Mengevaluasi ekspresi protein β III-tubulin sebagai penanda diferensiasi neuronal.
- d. Mengevaluasi ekspresi protein p-ERK sebagai indikator aktivasi jalur pensinyalan regenerasi pada sel PC12.
- e. Membandingkan konsentrasi dekstrosa yang paling optimal dalam memodulasi regenerasi saraf.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat pengembangan ilmu

- a. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat teoritik dalam memberikan informasi dan memperluas teori di bidang *regenerative medicine*, terutama dalam penggunaan dekstrosa dalam merangsang proliferasi dan remodelling pada sel neuron, yang penting dalam pengembangan terapi regeneratif.
- b. Menambah literatur ilmiah mengenai batas aman dan efektif konsentrasi dekstrosa dalam konteks penggunaan jaringan saraf pada proloterapi.
- c. Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi terhadap pemahaman ilmiah

mengenai efek konsentrasi dekstrosa dalam mekanisme regenerasi jaringan saraf, terutama terkait jalur sinyal molekuler dan ekspresi protein penyembuhan.

1.4.2. Manfaat aplikasi

- a. Memberikan informasi bagi praktisi medis terkait pilihan konsentrasi dekstrosa yang optimal untuk diterapkan pada pasien dengan keluhan nyeri yang melibatkan jaringan saraf sehingga meningkatkan efektivitas terapi dan mengurangi risiko kerusakan sel pada pasien.
- b. Menjadi dasar untuk penelitian lanjutan (in vitro, in vivo maupun uji klinis) dalam upaya standarisasi protokol proloterapi yang lebih spesifik terhadap jenis jaringan target.

1.5 Batasan Penelitian

- a. Penelitian dilakukan secara in vitro, sehingga hasilnya tidak langsung menggambarkan kondisi in vivo atau klinis.
- b. Hanya empat konsentrasi dekstrosa yang diteliti, yaitu 1 % , 5%, 10% dan 12,5%.
- c. Jenis sel yang digunakan terbatas pada *PC12*, yang merupakan model sel untuk neuron.
- d. Penanda regenerasi terbatas pada ekspresi β III-tubulin, dan p-ERK.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Proloterapi

Proloterapi adalah terapi yang melibatkan penyuntikan larutan iritan (biasanya berupa dekstrosa atau platelet rich plasma) ke dalam jaringan yang mengalami cedera atau nyeri kronis untuk merangsang proses penyembuhan alami tubuh, meningkatkan proliferasi sel-sel dan pembentukan jaringan ikat baru. Terapi ini banyak digunakan untuk kondisi muskuloskeletal, seperti nyeri punggung bawah, sendi, epicondilitis, dan ligamen yang lemah atau cedera (Reeves KD et al, 2015).

Regenerative medicine (RM) adalah bidang yang lebih luas yang bertujuan memulihkan fungsi jaringan atau organ yang rusak melalui pendekatan biologis termasuk cell therapy (mis. mesenchymal stem cells/MSCs), autologous blood-derived products (PRP, platelet lysate), scaffolds/biomaterials, dan teknik tissue engineering. RM menargetkan perbaikan struktural dan pemulihan fungsi dengan memanfaatkan mekanisme biologis endogen dan/atau sel/produk exogenous. Proloterapi dapat dipandang sebagai bagian dari spektrum intervensi regeneratif non-seluler, berbeda mekanisme dengan PRP atau MSCs tetapi sama-sama menargetkan perbaikan jaringan. PRP/platelet lysate bekerja lewat konsentrasi faktor pertumbuhan yang dilepaskan platelet; MSCs bekerja lewat diferensiasi, parakrin, dan immunomodulasi; scaffold/biomaterial menyediakan matriks fisik untuk regenerasi. Klinik dan penelitian sering mengevaluasi kombinasi (mis. proloterapi + PRP atau hydrodissection + platelet lysate) untuk memaksimalkan hasil—tetapi kombinasi ini menambah variabilitas dan memerlukan bukti terkontrol (DeChellis, D. M., & Cortazzo, M. H., 2011).

Pada konteks fase proliferasi inflamasi remodelling yang terkait dengan proses penyembuhan, proloterapi berperan sebagai berikut: (Lyftogt J, 2005)

1. Fase Inflamasi (Inflammation Phase):

- Pada tahap ini, tubuh mengalami reaksi peradangan untuk menanggapi cedera atau kerusakan jaringan. Proses ini melibatkan peningkatan aliran darah dan pengumpulan sel-sel inflamasi, termasuk makrofag, untuk membersihkan sel-sel mati atau rusak.

- Proloterapi dapat mempercepat fase inflamasi ini dengan merangsang respon inflamasi yang terkendali. Penyuntikan larutan iritan seperti dekstrosa dapat menstimulasi pelepasan mediator inflamasi dan faktor pertumbuhan yang penting untuk tahap penyembuhan selanjutnya.

2. Fase Proliferasi (Proliferation Phase):

- Pada fase ini, tubuh mulai membentuk jaringan ikat baru dan memperbaiki kerusakan yang ada, dengan pembentukan kolagen dan pembuluh darah baru.
- Proloterapi bekerja dengan merangsang fibroblas dan sel-sel mesenkimal untuk menghasilkan kolagen dan matriks ekstraseluler. Penyuntikan dekstrosa meningkatkan aliran darah lokal dan merangsang regenerasi jaringan ikat yang lebih kuat, meningkatkan stabilitas pada sendi atau ligamen yang rusak.

3. Fase Remodelling (Remodeling Phase):

- Pada fase ini, jaringan yang baru terbentuk mulai diperkuat dan disusun kembali agar lebih stabil dan fungsional. Kolagen yang awalnya bersifat elastis dan lemah mulai digantikan dengan kolagen tipe I yang lebih kuat.
- Proloterapi dapat mempercepat remodelling jaringan dengan meningkatkan kekuatan dan kestabilan ligamen atau tendon yang cedera. Selain itu, proliferasi pembuluh darah juga membantu meningkatkan pasokan oksigen dan nutrisi yang dibutuhkan untuk proses perbaikan jangka panjang.

Secara keseluruhan, proloterapi berperan penting dalam mendukung fase proliferasi dan remodelling dengan merangsang proses perbaikan alami tubuh, meningkatkan kekuatan dan fungsionalitas jaringan yang cedera, serta membantu mengurangi rasa sakit pada kondisi muskuloskeletal kronis. Sebagai perbandingan, injeksi kortikosteroid sering memberikan perbaikan jangka pendek tetapi dapat melemahkan jaringan tendon dan meningkatkan risiko ruptur. Sebaliknya, proloterapi mendukung regenerasi dan memperkuat struktur tendon.

Proloterapi pada fase akut dan kronis nyeri memiliki pengaruh yang berbeda, tergantung pada tahapan inflamasi dan mekanisme penyembuhan jaringan yang terlibat. Berikut penjelasan medis mengenai pengaruh proloterapi pada kedua fase tersebut: (Van Pelt, 2010)

1. Pengaruh Proloterapi pada Fase Akut Nyeri:

- Fase akut nyeri biasanya ditandai dengan reaksi inflamasi yang cepat sebagai respons terhadap cedera atau trauma. Pada tahap ini, proses peradangan yang melibatkan mediator inflamasi seperti sitokin dan prostaglandin sedang berlangsung, dan pembuluh darah mengalami dilatasi untuk meningkatkan aliran darah ke area yang cedera.
- Pada fase ini, proloterapi dapat memperburuk gejala karena dekstrosa (solusi iritan) yang digunakan dapat meningkatkan proses inflamasi lokal, menyebabkan peradangan yang lebih intens dan peningkatan edema di area cedera. Oleh karena itu, proloterapi pada fase akut tidak dianjurkan karena bisa memperburuk kondisi dan memperpanjang waktu pemulihan.
- Meskipun demikian, beberapa literatur menunjukkan bahwa proloterapi dengan dosis rendah pada tahap pasca-akut dapat merangsang penyembuhan jaringan dengan meningkatkan pembentukan kolagen setelah fase inflamasi awal berkurang.

2. Pengaruh Proloterapi pada Fase Kronis Nyeri:

- Fase kronis nyeri ditandai dengan adanya disfungsi jaringan yang terjadi setelah peradangan awal berakhir dan penyembuhan alami tidak terjadi secara optimal. Pada fase ini, degenerasi jaringan, terutama pada ligamen, tendon, dan sendi, seringkali telah terjadi karena proses penyembuhan yang lambat atau terhenti.
- Proloterapi pada fase kronis bekerja dengan menstimulasi proses reparatif melalui iritasi ringan yang menyebabkan mikrotrauma pada jaringan yang rusak. Hal ini merangsang tubuh untuk meningkatkan aliran darah dan membawa sel-sel reparatif seperti fibroblas dan sel endotel untuk mempercepat proses regenerasi dan pembentukan kolagen di area cedera.
- Dengan demikian, proloterapi membantu memperbaiki stabilitas jaringan, mempercepat proses penyembuhan jangka panjang, dan mengurangi nyeri pada pasien dengan nyeri punggung bawah kronis, osteoarthritis, dan cedera muskuloskeletal lainnya. Peningkatan pembentukan kolagen dan matriks ekstraseluler juga berkontribusi pada perbaikan fungsi dan penguatan jaringan yang melemah (Oh, S. et al., 2019).

Mekanisme Kerja Proloterapi pada Fase Kronis:

- Iritasi Terkontrol: Proloterapi menggunakan solusi iritan seperti dekstrosa yang

menciptakan reaksi inflamasi ringan di lokasi injeksi. Reaksi ini merangsang peningkatan aliran darah dan mengaktifkan proses penyembuhan jaringan.

- **Pembentukan Kolagen:** Dekstrosa merangsang aktivitas fibroblas, sel yang bertanggung jawab untuk pembentukan kolagen dan perbaikan jaringan ikat, yang mempercepat pemulihan dan memperbaiki kekuatan serta stabilitas pada ligamen dan tendon yang rusak.
- **Meningkatkan Fungsi Fisik:** Dengan memperbaiki struktur jaringan yang rusak dan meningkatkan stabilitas sendi atau ligamen, proloterapi dapat memperbaiki mobilitas dan fungsi area yang terkena, serta mengurangi rasa sakit yang mengganggu aktivitas fisik.

2.2 Jenis Proloterapi

Berikut beberapa Literatur mengenai jenis proloterapi:

1. Proloterapi dengan Dekstrosa:

- Dekstrosa adalah larutan gula yang digunakan untuk merangsang respons inflamasi terkontrol di area yang disuntik. Gleberzon, B., et al. (2011) dalam studi mereka tentang proloterapi menyebutkan bahwa 10-25% dextrose adalah konsentrasi yang paling umum digunakan dalam proloterapi. Konsentrasi ini memberikan efek iritasi yang cukup untuk merangsang respon inflamasi ringan yang diperlukan untuk perbaikan jaringan. 10% dextrose biasanya digunakan untuk kondisi yang lebih ringan atau pada pasien yang mungkin sensitif terhadap terapi iritan. 15%-25% dextrose lebih sering digunakan pada kondisi yang lebih kronis atau dalam jaringan yang lebih dalam, seperti tendonitis, ligamentitis, atau osteoarthritis. Volume yang disuntikkan bervariasi tergantung pada ukuran dan lokasi jaringan yang dirawat, serta tingkat keparahan kondisi. Secara umum, 2-10 mL dextrosa hipertonik dapat disuntikkan ke dalam area yang bermasalah per sesi. Biasanya, 1-2 mL disuntikkan untuk area yang lebih kecil atau jaringan superfisial. Untuk tendon atau ligamen yang lebih besar atau lebih dalam, dosis bisa mencapai 5-10 mL untuk setiap titik injeksi (Gleberzon, B., et al, 2011).
- **Mekanisme Kerja:** Dekstrosa disuntikkan ke dalam jaringan yang terluka atau mengalami nyeri. Proses ini menyebabkan iritasi ringan, yang merangsang tubuh untuk merespons

dengan meningkatkan aliran darah, membawa lebih banyak sel penyembuhan (seperti fibroblas) ke area tersebut, serta merangsang pembentukan kolagen dan jaringan ikat.

- Efektivitas:
 - Beberapa studi menunjukkan bahwa proloterapi dengan dekstrosa dapat membantu mengurangi nyeri kronis dan meningkatkan fungsionalitas pada sendi dan ligamen yang rusak, seperti pada nyeri punggung bawah, osteoarthritis, atau cedera ligamen. Penelitian klinis menunjukkan hasil positif dalam jangka panjang dengan banyak pasien melaporkan penurunan rasa sakit dan peningkatan mobilitas setelah beberapa sesi terapi.
 - Dekstrosa juga dikenal merangsang proses regenerasi pada tendon dan ligamen yang rusak, sehingga mempercepat pemulihan dan memperbaiki stabilitas jaringan.
 - Masume pada 2019 dan 2023 melakukan randomized controlled trial pada pasien tennis elbow dengan total 30 pasien pada 2019 dan 50 pasien pada 2023. Investigasi ini menunjukkan bahwa injeksi kortikosteroid dan proloterapi dekstrosa secara efisien meningkatkan nyeri dan fungsi pada pasien dengan epikondilitis lateral kronis. Pada kelompok proloterapi, perbaikan ini bertahan bahkan setelah 1 bulan masa tindak lanjut dan hasil setelah satu suntikan masih dapat ditingkatkan, sedangkan pada kelompok paralel, steroid hanya memberikan perbaikan jangka pendek. Temuan ini membuktikan bahwa proloterapi dekstrosa memiliki efek yang lebih baik dan lebih lama dalam mengobati tennis elbow kronis; namun, dampak olahraga dan pemasangan belat sebagai pengobatan dasar tidak boleh diabaikan dalam kemajuan pasien. Penelitian sebelumnya telah mencapai bukti tingkat 1B untuk kemanjuran proloterapi (Masume Bayat et al, 2012).
 - Sebuah artikel *systematic review and meta-analysis* tentang proloterapi dextrose pada kasus lateral epiphycondylitis yang ditulis oleh Mengting Zhu pada 2020, menyimpulkan bahwa proloterapi dengan dekstrosa hipertonik merupakan terapi yang efektif dalam mengelola lateral elbow tendinosis, dengan pengurangan nyeri

yang signifikan dan peningkatan fungsi sendi siku pada pasien. Hasil dari meta-analisis ini memberikan bukti yang lebih kuat untuk penggunaan proloterapi sebagai pilihan pengobatan untuk kondisi tendonitis kronis yang tidak merespons perawatan konvensional (Zhu, M., et al.,2020).

2. Proloterapi dengan kombinasi Dekstrosa dan Lidokain:

- Lidokain adalah obat anestesi lokal yang sering digunakan dalam proloterapi untuk mengurangi rasa sakit dan memberikan kenyamanan selama injeksi. Selain itu, lidokain juga memiliki efek antiinflamasi dan penurunan aktivitas saraf, yang membantu mengurangi rasa sakit sementara setelah injeksi. Menurut Sharma, H. M (2014) lidokain yang dianjurkan untuk proloterapi adalah dengan konsentrasi sekitar 1% hingga 2% (10-20 mg/ml). Konsentrasi yang lebih tinggi dapat meningkatkan risiko efek samping, sehingga penggunaan dalam dosis rendah lebih disarankan (Sharma, H. M., & Neeraj, R.,2014).
- Mekanisme Kerja: Lidokain memiliki efek antiinflamasi pada saraf yang iritasi di daerah cedera dan dapat memperbaiki nyeri segera setelah injeksi. Namun, efeknya lebih pendek dibandingkan dengan dekstrosa yang memiliki efek lebih jangka panjang.
- Efektivitas:
 - Lidokain dalam proloterapi dapat memberikan penurunan rasa sakit sementara, yang membantu pasien merasa lebih nyaman dan dapat memulai proses rehabilitasi atau latihan pemulihan lebih cepat.
 - Meskipun lidokain memberikan efek penghilang rasa sakit sementara, ia tidak merangsang proses penyembuhan jangka panjang seperti dekstrosa, yang lebih efektif dalam merangsang pembentukan kolagen dan regenerasi jaringan (Sharma, H. M., & Neeraj, R.,2014).
- Banyak praktisi menggunakan kombinasi dekstrosa dan lidokain dalam proloterapi. Lidokain digunakan untuk memberikan nyeri sementara yang lebih rendah selama proses injeksi, sedangkan dekstrosa digunakan untuk merangsang penyembuhan jangka panjang

dengan meningkatkan aliran darah dan mempercepat regenerasi jaringan. Kombinasi ini bisa memberikan keuntungan ganda: nyeri segera berkurang (efek lidokain), sementara efek penyembuhan dan perbaikan jaringan dapat tercapai dalam jangka panjang (efek dekstrosa).

- Woo, M. S., et al pada 2016 melakukan penelitian yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi dekstrosa dan lidokain yang optimal dalam terapi injeksi regeneratif (seperti proloterapi) dengan menggunakan model in vitro (dalam laboratorium, di luar tubuh manusia). Fokus penelitian ini adalah untuk mencari konsentrasi yang dapat memaksimalkan respons inflamasi yang terkontrol untuk penyembuhan jaringan tanpa menyebabkan efek samping yang berbahaya atau mengganggu proses regenerasi jaringan. Penelitian ini menggunakan sel fibroblas atau sel yang terlibat dalam pembentukan jaringan ikat dan kolagen dalam tubuh untuk menguji pengaruh dari berbagai konsentrasi dekstrosa dan lidokain terhadap proliferasi sel, viabilitas sel, dan produksi kolagen. Dekstrosa digunakan untuk merangsang inflamasi ringan yang penting dalam stimulasi penyembuhan jaringan, sedangkan lidokain digunakan untuk mengurangi rasa sakit dan memberikan efek anestesi lokal. Konsentrasi dekstrosa yang diuji berkisar antara 5%-25%, sementara lidokain diuji dalam konsentrasi 0,5%-2%. Hasil penelitiannya dekstrosa dalam konsentrasi 10%-20% menunjukkan efek yang lebih efektif dalam merangsang proliferasi sel fibroblas dan produksi kolagen, yang sangat penting untuk perbaikan tendon dan ligamen. Dekstrosa ini merangsang inflamasi ringan yang dapat membantu dalam proses penyembuhan jaringan. Pada konsentrasi lebih tinggi dari 20%, terjadi penurunan pada viabilitas sel dan produksi kolagen, menunjukkan bahwa konsentrasi yang terlalu tinggi dapat berisiko menyebabkan iritasi berlebihan atau kerusakan sel. Hasil penelitian tersebut juga menunjukkan Lidokain dalam konsentrasi 1%-2% efektif dalam mengurangi rasa sakit tanpa mengganggu aktivitas seluler yang diperlukan untuk penyembuhan. 0,5% lidokain juga menunjukkan hasil yang baik dalam menenangkan saraf yang teriritasi tanpa mengurangi viabilitas sel. Dosis lidokain yang lebih tinggi (misalnya 2%) dapat menghambat proliferasi sel fibroblas dan produksi kolagen, meskipun efek ini lebih terlihat pada konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah. Dalam penelitian ini menunjukkan Kombinasi dekstrosa 10%-20% dengan lidokain 1%-2% menunjukkan hasil yang optimal dalam mengurangi rasa sakit sementara, sambil tetap merangsang proses penyembuhan jaringan tanpa menyebabkan efek samping yang berbahaya pada sel. Kombinasi ini menghasilkan efek sinergis di mana lidokain

mengurangi rasa sakit segera, sementara dextrosa merangsang proses penyembuhan jangka panjang (Woo, M. S., et al.,2016).

3. Platelet Rich Plasma (PRP) didefinisikan sebagai volume plasma autologus dengan konsentrasi trombosit jauh di atas nilai dasar. Jumlah trombosit rata-rata normal dalam darah lengkap adalah sekitar 200.000/ μ L, sehingga jumlah trombosit dalam PRP seharusnya rata-rata 1.000.000/ μ L. Trombosit mengandung faktor-faktor pertumbuhan dan protein yang berperan dalam proses penyembuhan dan regenerasi jaringan. PRP diperoleh melalui proses pemisahan darah di laboratorium, di mana darah pasien diambil dan diproses untuk meningkatkan konsentrasi trombosit sebelum disuntikkan kembali ke area yang membutuhkan perbaikan (Alves R et al , 2018)

Trombosit adalah komponen seluler tidak berinti yang terdapat dalam seluruh darah bersama dengan sel darah putih dan merah. Mereka adalah fragmen sitoplasma megakariosit yang terbentuk di sumsum tulang. Trombosit lebih kecil dari sel darah lainnya yang berukuran diameter sekitar 2 μ m. Jumlah trombosit normal pada manusia sehat berkisar antara 150.000 hingga 350.000 per mikroliter (μ L). Bersamaan dengan fibrin, trombosit juga penting dalam fungsi hemostatik darah.

Trombosit mengandung banyak protein, sitokin, dan faktor biologis lainnya. Lebih dari 300 protein teridentifikasi dilepaskan dari trombosit, konsentrasinya ada yang rendah (Thrombospondin) dan ada pula yang tinggi (trombosit glikoprotein V). Banyak faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh butiran trombosit. Ada tiga jenis butiran utama dalam trombosit; Butiran alfa (α), butiran padat, dan lisosom. Di antara butiran-butiran ini, butiran α dan padat hanya terdapat pada trombosit dan megakariosit (Coppinger JA et al, 2004).

Terdapat rata-rata 80 butiran α di setiap trombosit dan jumlah tersebut melebihi jumlah butiran padat. Butiran padat mengandung molekul kecil seperti serotonin, ADP, dan fosfat, sedangkan butiran α mengandung protein termasuk faktor hemostatik seperti Faktor V, VWF, fibrinogen; faktor angiogenik seperti angiogenin, VEGF; faktor antiangiogenik seperti angiotensin, PF4; faktor pertumbuhan seperti PGFF, bFGF, SDF 1 α ; protease seperti MMP2, MMP9; faktor nekrotik seperti TNF α , TNF β , dan sitokin (Heijnen HF et al, 1998).

Faktor pertumbuhan trombosit bersama dengan faktor pertumbuhan plasma dan fibrin merangsang proliferasi dan migrasi sel, sintesis dan pengendapan komponen matriks ekstraseluler, angiogenesis dan remodeling jaringan (Milano G et al, 2019). Jadi ketika PRP

disuntikkan, ia mengantarkan faktor pertumbuhan kedalam jaringan dan pada saat yang sama waktu mensimulasikan dan memperkuat respons penyembuhan spontan di area cedera (Gbr. 2). Perancah fibrin dihasilkan in situ dan berinteraksi dengan protein matriks ekstraseluler dan sel yang berikatan dengan fibronectin. Hal ini menghasilkan perancah tiga dimensi sementara, yang secara bertahap melepaskan dan mempertahankan konsentrasi faktor pertumbuhan pada perancah.

Jadi secara garis besar mekanisme PRP bekerja dengan cara:

- Faktor Pertumbuhan: Trombosit dalam PRP mengandung faktor pertumbuhan yang dapat merangsang perbaikan jaringan, mempercepat penyembuhan, dan mengurangi peradangan.
- Regenerasi Jaringan: PRP dapat merangsang proliferasi sel-sel yang terlibat dalam proses penyembuhan, seperti sel fibroblas dan kondrosit, yang membantu memperbaiki jaringan yang rusak.
- Pengurangan Peradangan: PRP memiliki efek anti-inflamasi yang dapat membantu mengurangi rasa sakit dan peradangan di area yang terpengaruh

2.3 Studi In Vitro dan In Vivo Proloterapi Dekstrosa

Tujuan utama dari proloterapi dekstrosa adalah menstimulasi respon penyembuhan alami tubuh dengan meningkatkan proses regenerasi jaringan, memperbaiki matriks ekstraseluler, serta merangsang ekspresi faktor pertumbuhan dan protein regeneratif (Reeves et al., 2015; DeChellis & Cortazzo, 2011). Konsentrasi dekstrosa yang digunakan dalam proloterapi sangat bervariasi, bergantung pada target jaringan, indikasi klinis, dan desain penelitian. Studi in vitro dan in vivo menunjukkan bahwa konsentrasi dekstrosa rendah ($\leq 5\%$) umumnya tidak cukup menimbulkan efek proliferasi yang signifikan, sementara konsentrasi menengah hingga tinggi (10–25%) dapat menginduksi stimulasi sel fibroblas, peningkatan faktor pertumbuhan, dan deposisi kolagen (Rabago et al., 2009; Distel & Best, 2011).

American College of Rheumatology (ACR) menyebutkan bahwa dekstrosa 10–15% sering digunakan untuk injeksi intra-artikular, karena mampu memberikan stimulasi biologis tanpa menimbulkan nekrosis jaringan yang berlebihan (Topol et al., 2005). Sedangkan pada

injeksi jaringan lunak atau ligamentum, konsentrasi yang lebih tinggi, hingga 20–25%, dapat digunakan untuk memberikan efek iritasi yang lebih kuat (Reeves & Hassanein, 2000).

Penelitian klinis yang dilakukan oleh Rabago et al. (2013) pada pasien osteoarthritis lutut menunjukkan bahwa injeksi proloterapi dengan dekstrosa 15% memberikan perbaikan nyeri dan fungsi yang signifikan dibandingkan dengan plasebo. Di sisi lain, penelitian laboratorium pada kultur sel fibroblas dan tendon memperlihatkan bahwa dekstrosa 10% mampu meningkatkan proliferasi fibroblas tanpa menginduksi apoptosis berlebihan (Yelland et al., 2009).

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi dekstrosa yang paling sering dianjurkan untuk proloterapi berada pada rentang 10–15% untuk injeksi intra-artikular serta 15–25% untuk injeksi jaringan ikat atau ligamentum, menyesuaikan dengan tujuan stimulasi dan keamanan jaringan.

2.3.1 Studi In Vitro

Studi in vitro memberikan dasar mekanistik mengenai bagaimana dextrose bekerja pada tingkat sel. Penelitian oleh Woo et al. (2016; 2021) menunjukkan bahwa konsentrasi dextrose yang tepat dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan memodulasi ekspresi faktor pertumbuhan serta protein regeneratif seperti kolagen tipe I. Namun, konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menurunkan viabilitas sel dan menginduksi jalur apoptosis, yang mengindikasikan adanya efek dosis-respons yang krusial. Penelitian lain oleh Güran et al. (2018) melaporkan bahwa paparan dextrose hipertonik dapat mengubah ekspresi faktor pertumbuhan dan protein apoptosis pada kultur fibroblas, sehingga mendukung hipotesis bahwa dextrose berperan sebagai “biological trigger” bagi mekanisme regenerasi. Selain itu, studi Benazzoug et al. (1998) menyoroti bahwa kondisi hiperglikemik dapat meningkatkan ekspresi kolagen oleh fibroblas, yang berimplikasi positif pada pembentukan jaringan ikat baru dalam konteks proloterapi. Penelitian pada kultur myoblast C2C12 oleh Dohl et al. (2018) juga menemukan bahwa paparan glukosa memengaruhi jalur MAPK/ERK, yang berperan penting dalam proliferasi, diferensiasi, dan regenerasi otot. Studi pada kultur C2C12 myoblast menunjukkan bahwa konsentrasi dekstrosa $\leq 5\%$ umumnya hanya berfungsi sebagai media energi tanpa menimbulkan stimulasi proliferasi yang signifikan (Blau, Chiu & Webster, 1983). Konsentrasi 10% dilaporkan mampu meningkatkan proliferasi fibroblas dan myoblast tanpa menimbulkan apoptosis yang berlebihan (Liu et al., 2019). Pada konsentrasi lebih tinggi, seperti 15–20%, dekstrosa dapat menginduksi

stres osmotik yang merangsang jalur inflamasi ringan, pelepasan faktor pertumbuhan (misalnya TGF- β , IGF-1), dan diferensiasi sel otot yang lebih cepat (Hackett, 2016). Hal ini mendukung alasan penggunaan dekstrosa 10–15% dalam studi proloterapi yang ditujukan untuk regenerasi jaringan otot atau tendon, karena konsentrasi tersebut cukup untuk menimbulkan respons biologis tanpa toksisitas seluler yang signifikan.

Pada model sel saraf PC12, dekstrosa berperan ganda, baik sebagai sumber energi maupun sebagai stimulus hiperosmolar. Konsentrasi fisiologis (sekitar 5 mM atau $\pm 0,1\%$) hanya mempertahankan viabilitas sel, namun tidak menimbulkan efek proliferasi atau diferensiasi (Greene & Tischler, 1976). Penelitian laboratorium menunjukkan bahwa paparan dekstrosa dengan konsentrasi 10–15% dapat meningkatkan viabilitas neuron, menstimulasi diferensiasi aksonal, dan meningkatkan ekspresi marker neuronal seperti β III-tubulin (Yang et al., 2017). Namun, konsentrasi yang lebih tinggi ($>20\%$) berpotensi menimbulkan stres oksidatif dan apoptosis pada sel saraf (Wei et al., 2015). Oleh karena itu, dalam konteks proloterapi yang menargetkan regenerasi jaringan dengan komponen saraf, dekstrosa 10–15% dianggap optimal untuk memberikan stimulasi biologis tanpa menimbulkan efek sitotoksik berlebihan.

Secara keseluruhan, pada model myoblast dan neuron, konsentrasi dekstrosa yang efektif berada pada rentang 10–15%. Rentang ini dianggap aman untuk menstimulasi proliferasi dan diferensiasi tanpa menyebabkan apoptosis yang signifikan, sehingga sesuai dengan konsentrasi yang digunakan pada studi proloterapi in vivo. Dengan demikian, bukti in vitro secara konsisten mendukung peran proloterapi dalam menstimulasi proses regeneratif, meskipun perlu dikaji lebih lanjut dosis optimal untuk menghindari sitotoksitas. Penelitian oleh Harting et al. (2024) merupakan studi in vitro yang mengevaluasi mekanisme kerja proloterapi dekstrosa terhadap sel fibroblas. Dalam penelitian tersebut, fibroblas MRC-5 dipaparkan pada berbagai konsentrasi dekstrosa (5–25%) selama 15–120 menit, kemudian dianalisis menggunakan uji XTT untuk menilai aktivitas metabolik sebagai indikator viabilitas dan proliferasi sel. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa konsentrasi tinggi dekstrosa (terutama 25%) atau paparan lama pada konsentrasi menengah (10–20%) menyebabkan penurunan viabilitas sel. Namun, menariknya, efek rebound proliferasi ditemukan 48 jam setelah paparan, terutama pada konsentrasi tinggi (15–25%) dengan paparan singkat (30–60 menit), atau konsentrasi lebih rendah (10%) dengan paparan lebih lama (120 menit). Selain itu, supernatan dari sel yang telah dipaparkan dekstrosa tidak menunjukkan efek toksik terhadap fibroblas baru, menunjukkan bahwa efek dekstrosa tidak dimediasi oleh faktor sekretorik yang merugikan. Secara keseluruhan, penelitian tersebut

menunjukkan bahwa dekstrosa dapat menimbulkan respons biologis bifasik, yaitu efek awal berupa stres atau penurunan viabilitas, diikuti dengan peningkatan proliferasi sel. Temuan ini mendukung hipotesis bahwa proloterapi dekstrosa bekerja melalui stimulasi regenerasi jaringan melalui mekanisme inflamasi terkontrol dan aktivasi proliferasi sel (Harting et al., 2024). Durasi paparan 30, 60, dan 120 menit kemungkinan dipilih untuk merepresentasikan fase akut respons sel terhadap stres osmotik dekstrosa serta untuk meniru paparan singkat dalam kondisi klinis proloterapi. Variasi durasi ini memungkinkan evaluasi efek yang bergantung pada waktu, di mana paparan lebih lama cenderung meningkatkan efek sitotoksik, sedangkan paparan singkat dapat memicu respons proliferasi sekunder.

2.3.2 Studi In Vivo

Efektivitas proloterapi dalam studi in vivo telah dievaluasi melalui uji klinis maupun studi eksperimental pada hewan. Reeves et al. (2015) melaporkan bahwa proloterapi berbasis dextrose

memberikan hasil positif dalam mengurangi nyeri muskuloskeletal kronis, termasuk tendinopati dan nyeri sendi. Studi klinis oleh Zhu et al. (2020) dalam bentuk meta-analisis menunjukkan bahwa injeksi dextrose memberikan perbaikan signifikan pada pasien dengan tendinosis lateral siku dibandingkan dengan kontrol, baik dalam hal penurunan nyeri maupun peningkatan fungsi. Temuan serupa juga didukung oleh Oh et al. (2019) yang melaporkan kombinasi proloterapi dengan fisioterapi lebih efektif dibandingkan salah satu intervensi tunggal.

Pada kasus osteoarthritis, Bayat et al. (2023) menemukan bahwa proloterapi dextrose memberikan hasil yang sebanding, bahkan lebih baik dalam jangka panjang, dibandingkan injeksi kortikosteroid intra-artikular, baik dalam pengurangan nyeri maupun peningkatan fungsi sendi lutut. Gleberzon et al. (2011) dan Sharma & Neeraj (2014) juga menguatkan bukti bahwa proloterapi dapat menjadi terapi alternatif non-bedah yang efektif pada kondisi muskuloskeletal kronis dengan efek samping minimal.

Secara keseluruhan, bukti in vitro menunjukkan bahwa dextrose dalam proloterapi dapat memengaruhi viabilitas sel, meningkatkan proliferasi fibroblas, dan merangsang ekspresi protein regeneratif seperti kolagen tipe I serta aktivasi jalur MAPK/ERK. Sementara itu, bukti in vivo baik dari studi hewan maupun uji klinis menunjukkan bahwa proloterapi efektif dalam

menurunkan nyeri dan memperbaiki fungsi pada kondisi muskuloskeletal kronis, termasuk tendinopati, nyeri punggung bawah, dan osteoarthritis. Meski demikian, efektivitas proloterapi masih dipengaruhi oleh faktor seperti konsentrasi larutan, teknik injeksi, lokasi jaringan target, serta kombinasi dengan modalitas terapi lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa proloterapi memiliki dasar biologis yang kuat dari hasil penelitian *in vitro*, sekaligus didukung oleh bukti klinis *in vivo* yang menunjukkan efektivitasnya.

2.4 Efektifitas Proloterapi pada PC12 (sel neuron) dan neuropati

2.4.1 Efektifitas Proloterapi pada PC12 (sel neuron)

Proloterapi dekstrosa telah digunakan secara klinis untuk meningkatkan proses regeneratif pada jaringan muskuloskeletal dan meredakan nyeri neuropatik. Kendati demikian, mekanisme molekuler seperti proliferasi sel, sekresi growth factors, hingga ambang toksisitas belum sepenuhnya jelas, sehingga diperlukan pendekatan *in-vitro* yang sistematis. Model kultur sel PC12 (sel neuron) adalah alat penting untuk memahami bagaimana konsentrasi dekstrosa mempengaruhi fungsi dan viabilitas sel. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa konsentrasi dekstrosa yang terlalu tinggi dapat menyebabkan stres osmotik ekstrem dan apoptosis pada berbagai jenis sel, menjadikan rentang dosis sebagai fokus utama penelitian ini.

PC12 adalah lini sel turunan pheochromocytoma dari kelenjar adrenal tikus. Sel ini unik karena dapat berdiferensiasi menjadi neuron mirip-simpatis ketika distimulasi oleh *nerve growth factor* (NGF). Setelah stimulasi, PC12 akan berhenti membelah dan mulai memanjang membentuk struktur **neurit** yang menyerupai akson dan dendrit. Karena sifat tersebut, PC12 dianggap sebagai model ideal untuk meneliti proses diferensiasi, neuroregenerasi, mekanisme sinyal molekuler, hingga respon neuron terhadap stimulus kimiawi maupun fisik. Selain itu, PC12 juga mempertahankan sifat sel neuron simpatik, termasuk kemampuan mensekresikan katekolamin, sehingga sering digunakan dalam studi neurotransmisi, neurotoksisitas, maupun neuroproteksi (Vaudry et al., 2002). Sejak pertama kali dilaporkan oleh Greene & Tischler (1976), PC12 menjadi salah satu model paling banyak digunakan dalam penelitian neurobiologi, khususnya terkait regenerasi saraf, neurotoksisitas, dan mekanisme pensinyalan seluler. PC12 juga sering digunakan untuk mengevaluasi efek agen regeneratif terhadap ekspresi protein spesifik neuron, seperti β III-tubulin (penanda sitoskeleton neuron), p-ERK (penanda aktivasi MAPK pathway), dan GAP-43 yang berhubungan dengan pertumbuhan akson. Model ini sangat

relevan dalam studi regenerasi saraf karena memberikan gambaran awal bagaimana intervensi dapat memengaruhi proses neuroplastisitas dan perbaikan jaringan saraf (Tischler & Greene, 1980).

PC12 adalah model kultur neuron yang dikenal sensitif terhadap kondisi metabolik ekstrem. Paparan glukosa pada konsentrasi sekitar 13,5 mg/ml (~sejumlah > 75 mM) mengurangi viabilitas secara signifikan setelah 48 jam dan memicu apoptosis yang dimediasi oleh rasio Bax/Bcl-2 yang meningkat serta pola DNA laddering—penanda klasik apoptosis mitokondrial—pada PC12 (Sharifi, A. M et al, 2007). Studi metabolomik lain menunjukkan bahwa viabilitas PC12 menurun tajam saat dipaparkan dengan 75 mM glukosa selama 72 jam, dibanding kontrol 25 mM, terlepas dari kontrol osmolar (mannitol) (Chen M et al, 2016). Dengan demikian, neuron lebih rentan terhadap efek hiperosmolaritas glukosa tinggi dibanding sel otot.

Penggunaan PC12 dalam penelitian regenerasi merepresentasikan regenerasi saraf. Hal ini penting dalam konteks nyeri muskuloskeletal kronis, cedera tendon-ligamen, maupun neuropati, di mana perbaikan jaringan otot dan saraf sering berjalan beriringan. Dengan mengevaluasi viabilitas, proliferasi, migrasi, dan ekspresi protein regeneratif pada model sel ini, peneliti dapat memperoleh gambaran menyeluruh mengenai potensi agen regeneratif seperti dekstrosa proloterapi, PRP, atau stem cell-conditioned medium sebelum melangkah pada uji in vivo dan klinis.

Secara garis besar, konsentrasi dekstrosa rendah hingga sedang ($\leq 5\%$ atau $\leq \sim 278$ mM) sering digunakan dalam injeksi proloterapi klinis—misalnya D5W dalam perineural proloterapi—karena didukung oleh bukti klinis terhadap nyeri neuropatik. Namun, dalam konteks kultur sel, ambang toksisitas jauh lebih rendah (sekitar beberapa puluhan mM) tergantung tipe sel. Oleh karena itu, studi komparatif mengenai dosis dekstrosa 10%, 12,5%, dan 15% (sekitar 555 mM, 694 mM, dan 833 mM) dapat membantu memetakan rentang di mana efek proloterapi (misalnya stimulasi faktor pertumbuhan, proliferasi) tercapai tanpa mengorbankan viabilitas sel—atau sebaliknya, memicu respons toksik.

Respons seluler terhadap dekstrosa hipertonik melibatkan beberapa jalur: (1) stres osmotik/ mikro-trauma yang bisa memicu jalur inflamasi dan sekresi faktor pertumbuhan (TGF- β , PDGF), (2) jalur apoptosis via sirtuin-caspase-faktor pro-apoptotik, (3) pada neuron: stress oksidatif,

homeostasis ion yang terganggu, dan jalur Bax/Bcl-2 seperti pada PC12 dilaporkan. Dalam konteks C2C12, AKT dan sirtuin menjadi jalur penting yang mengatur proliferasi dan diferensiasi— termasuk sensitivitas terhadap insulin dan myogenesis.

Berdasarkan tinjauan di atas, desain in-vitro optimal harus mencakup kontrol (media standar tanpa dekstrosa tambahan (0%)), dosis terapeutik potensial, dosis menengah: 10%–12,5% untuk menguji efektivitas proliterapi klasik, dosis hipertonic tinggi/toksik kontrol: 15% sebagai titik ambang stres sel. Pengukuran harus meliputi: viabilitas (MTT/CCK-8), apoptosis (Annexin V/PI dsb.), ekspresi growth factor/inflamasi (qPCR/ELISA), serta fungsi sel spesifik (diferensiasi myotube C2C12; neuritogenesis PC12). Kontrol osmolar (mis., manitol) juga penting untuk memisahkan efek osmotik dari efek spesifik glukosa.

2.4.2 Efektifas Proliterapi pada neuropati

Dalam berbagai studi nyeri neuropatik, konsentrasi yang paling sering diteliti adalah dekstrosa 5%. Sebagian besar uji acak terkontrol pada neuropati jebakan perifer seperti carpal tunnel syndrome (CTS) dan neuropati ulnar menggunakan konsentrasi ini, dengan hasil yang secara konsisten menunjukkan perbaikan klinis yang signifikan (Wu et al., 2017; Wu et al., 2018; Lin et al., 2020; Li et al., 2021). Selain itu, berbagai tinjauan sistematis juga mendukung efektivitas dekstrosa 5% dalam konteks tersebut (Bertrand et al., 2016; Uberoi et al., 2019).

Sebaliknya, studi proliterapi muskuloskeletal lebih banyak menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu antara 10% hingga 50%, dan umumnya tidak berfokus pada mekanisme neuropati jebakan. Bukti dalam konteks ini sebagian besar berasal dari studi observasional atau seri kasus, sehingga tingkat evidensinya lebih rendah dibandingkan uji acak terkontrol (Reeves & Hassanein, 2000).

Bukti komparatif langsung antar konsentrasi dekstrosa masih terbatas, dan hingga saat ini belum ada uji acak berkualitas tinggi yang menunjukkan bahwa konsentrasi di atas 5% memberikan manfaat klinis yang lebih baik pada nyeri neuropatik perifer (Bertrand et al., 2016).

Protokol terapi bervariasi secara signifikan antar studi. Sebagian besar uji acak menggunakan injeksi perineural dengan panduan ultrasonografi dalam satu sesi, meskipun beberapa studi

menerapkan injeksi berulang atau multi-sesi. Namun, karena heterogenitas desain studi, frekuensi terapi optimal belum dapat ditentukan secara pasti (Wu et al., 2018; Li et al., 2021).

Volume injeksi merupakan faktor klinis yang penting, terutama pada CTS. Studi menunjukkan bahwa volume perineural yang lebih besar (sekitar 4–10 mL) berkaitan dengan perbaikan gejala dan parameter sonografi yang lebih baik dibandingkan volume kecil (Li et al., 2021; Wu et al., 2018). Sebaliknya, konsentrasi dekstrosa yang lebih tinggi umumnya diberikan dalam volume kecil dengan interval yang lebih panjang, mencerminkan penggunaannya dalam proloterapi non-neuropatik.

Teknik yang paling umum digunakan adalah hidrodiseksi perineural dengan panduan ultrasonografi, yang terbukti efektif pada neuropati jebakan (Wu et al., 2017; Wu et al., 2018). Teknik alternatif seperti injeksi subkutan juga telah dilaporkan, namun bukti yang mendukungnya masih terbatas (Uberoi et al., 2019).

Efek terhadap Nyeri Neuropatik

Neuropati Entrapment

Bukti terkuat ditemukan pada neuropati *entrapment* perifer. Uji acak terkontrol menunjukkan bahwa injeksi dekstrosa 5% secara signifikan memperbaiki nyeri, keparahan gejala, dan fungsi dibandingkan plasebo atau kortikosteroid, dengan efek yang dapat bertahan dalam jangka waktu tertentu (Wu et al., 2017; Wu et al., 2018; Li et al., 2021). Temuan ini mendukung penggunaan dekstrosa dalam nyeri neuropatik yang disebabkan oleh kompresi mekanik.

Neuralgia Pascaherpes dan CRPS

Bukti untuk kondisi neuropatik campuran seperti neuralgia pascaherpes dan complex regional pain syndrome (CRPS) masih terbatas dan menunjukkan hasil yang bervariasi. Sebagian besar data berasal dari studi retrospektif, yang menunjukkan kemungkinan efek analgesik, namun respons terapi tidak konsisten (Uberoi et al., 2019). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan mekanisme patofisiologi seperti sensitisasi sentral dan inflamasi.

Neuropati Diabetik

Bukti untuk neuropati diabetik masih terbatas. Beberapa studi menunjukkan bahwa injeksi dekstrosa 10% dapat mengurangi nyeri, namun keterbatasan metodologi membuat interpretasi hasil menjadi kurang kuat (Uberoi et al., 2019).

Nyeri Punggung Bawah dengan Komponen Neuropatik

Pada nyeri punggung bawah dengan komponen neuropatik, injeksi epidural dekstrosa 5% menunjukkan penurunan nyeri signifikan dalam jangka pendek dibandingkan saline, meskipun efek ini tidak selalu bertahan dalam jangka panjang (Reeves & Hassanein, 2000). Studi lain menunjukkan bahwa proloterapi dapat memberikan perbaikan jangka panjang yang lebih baik dibandingkan injeksi steroid epidural (Bertrand et al., 2016).

Durasi Efek Analgesik

Injeksi dekstrosa umumnya memberikan pereda nyeri yang cepat namun dengan durasi yang bervariasi. Efek jangka pendek didukung oleh bukti kuat dari uji acak, sedangkan efek jangka menengah (1–3 bulan) paling konsisten terlihat pada neuropati jebakan (Wu et al., 2017; Wu et al., 2018). Efek jangka panjang (>6 bulan) juga dilaporkan pada beberapa kondisi, meskipun sebagian besar berasal dari studi observasional (Li et al., 2021).

Keamanan

Secara umum, injeksi dekstrosa memiliki profil keamanan yang baik. Efek samping yang dilaporkan bersifat ringan dan sementara, seperti memar lokal atau nyeri di lokasi injeksi, dan biasanya hilang dalam 24 jam. Tidak ditemukan komplikasi serius dalam uji acak terkontrol (Wu et al., 2018; Li et al., 2021). Selain itu, tidak ditemukan pola efek samping berat yang bergantung pada konsentrasi dekstrosa (Bertrand et al., 2016).

2.5 Uji efektifitas proloterapi

2.5. 1. Uji Viabilitas Sel

Viabilitas sel merupakan parameter utama untuk menilai apakah suatu perlakuan (misalnya dekstrosa hipertonik) bersifat toksik atau mendukung kelangsungan hidup sel. Beberapa metode

yang banyak digunakan antara lain:

- MTT Assay

Metode ini didasarkan pada kemampuan enzim mitokondria sel hidup untuk mereduksi garam tetrazolium (MTT) menjadi kristal formazan berwarna ungu, yang dapat diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 570 nm (Mosmann, 1983). Uji MTT sangat populer karena sederhana, sensitif, dan banyak diaplikasikan pada kultur C2C12 maupun PC12 untuk menilai efek hiperglikemia terhadap viabilitas.

- CCK-8 Assay (Cell Counting Kit-8)

CCK-8 merupakan modifikasi MTT yang lebih sensitif, menggunakan garam tetrazolium

larut air (WST-8). Keunggulannya adalah tidak memerlukan langkah pelarutan formazan sehingga lebih cepat dan tidak merusak sel (Zhang et al., 2012).

- Trypan Blue Exclusion Test

Uji ini didasarkan pada permeabilitas membran: sel hidup menolak masuknya pewarna, sementara sel mati menyerap pewarna biru. Meski sederhana, metode ini cenderung kurang sensitif untuk membedakan sel hidup yang sedang stres metabolik (Strober, 2001).

Dengan demikian, kombinasi MTT/CCK-8 dengan Trypan Blue dapat memberikan gambaran menyeluruh mengenai viabilitas sel setelah perlakuan dekstroza.

2.5.2 Uji Migrasi Sel

Migrasi sel penting untuk menilai potensi regeneratif dan penyembuhan luka, terutama pada sel otot (C2C12).

- *Scratch Wound Assay (Wound Healing Assay)*

Teknik ini dilakukan dengan membuat “goresan” pada monolayer kultur sel, kemudian

mengamati kecepatan sel menutup celah tersebut. Dengan mikroskop, area celah difoto pada waktu tertentu (0, 12, 24, 48 jam) dan dihitung persentase penutupan luka. Metode ini banyak digunakan untuk menilai efek glukosa tinggi pada mobilitas C2C12 (Liang et al., 2007).

- *Transwell Migration Assay*

Menggunakan sistem membran berpori: sel ditempatkan pada kompartemen atas, kemudian dimigrasikan melalui pori menuju sisi bawah yang mengandung faktor kemotaktik. Jumlah sel yang menembus membran dihitung dengan pewarnaan kristal violet atau DAPI. Assay ini lebih kuantitatif dibanding scratch assay (Boyden, 1962).

2.5.3 Proliferasi Sel

Proliferasi dapat dievaluasi dengan beberapa metode:

- *BrdU Incorporation Assay*

Mengukur sintesis DNA dengan mendeteksi integrasi BrdU (bromodeoxyuridine), analog timidin, ke dalam DNA sel yang sedang bereplikasi. Deteksi dilakukan dengan antibodi anti- BrdU (Gratzner, 1982).

- *Ki-67 Immunostaining*. Ki-67 adalah protein nukleus yang diekspresikan pada semua fase siklus sel kecuali fase istirahat (G0). Peningkatan ekspresi Ki-67 menunjukkan aktivitas proliferasi sel (Gerdes et al., 1984).

- *CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) Dilution Assay*

Digunakan untuk melacak pembelahan sel berdasarkan peluruhan intensitas fluoresensi seiring bertambahnya siklus pembelahan (Lyons & Parish, 1994).

2.5.4 Diferensiasi Sel

Pada PC12 neurons, diferensiasi dapat dievaluasi dengan neurite Outgrowth Assay, di mana jumlah dan panjang neurit (proyeksi neuron) diukur secara mikroskopis setelah stimulasi. Faktor pertumbuhan saraf (NGF) biasanya digunakan sebagai kontrol positif (Greene & Tischler, 1976).

2.5.5 Apoptosis dan Nekrosis

Apoptosis adalah salah satu mekanisme penting yang muncul akibat stres osmotik glukosa tinggi.

- Annexin V/Propidium Iodide (PI) Staining dengan flow cytometry: Annexin V menandai fosfatidilserin yang terekspos pada membran sel awal apoptosis, sementara PI menandai sel yang sudah kehilangan integritas membran (Vermes et al., 1995).
- Caspase-3/-9 Activity Assay, digunakan untuk mendeteksi jalur apoptosis intrinsik mitokondria (Nicholson et al., 1995).
- TUNEL Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), mendeteksi fragmentasi DNA khas apoptosis (Gavrieli et al., 1992).

Dengan mengombinasikan uji-uji di atas, efektivitas dan keamanan berbagai konsentrasi dekstrosa pada model in-vitro (PC12) dapat dievaluasi secara komprehensif. Viabilitas menentukan tingkat kelangsungan hidup, migrasi dan proliferasi menilai potensi regenerasi, diferensiasi menunjukkan kapasitas fungsional sel, sedangkan apoptosis memberi batas ambang toksisitas. Hasil tersebut akan relevan untuk menyesuaikan dosis proloterapi yang tepat pada studi klinis.

Proses regenerasi jaringan saraf merupakan fenomena kompleks yang melibatkan interaksi antara sel, matriks ekstraseluler (extracellular matrix/ECM), serta aktivasi berbagai jalur sinyal intraseluler. Salah satu pendekatan yang banyak dikaji dalam konteks regenerasi adalah proloterapi dengan dekstrosa, yaitu pemberian larutan dekstrosa hiperosmolar yang diyakini mampu memicu respons regeneratif melalui stimulasi ringan terhadap stres seluler. Respons ini dapat dimonitor melalui ekspresi berbagai protein yang berperan sebagai penanda regenerasi, di antaranya β III-tubulin, dan p-ERK.

Salah satu penanda penting regenerasi pada sistem saraf adalah β III-tubulin, sebuah isoform dari protein tubulin yang spesifik diekspresikan oleh neuron. β III-tubulin membentuk mikrotubulus yang menjadi komponen sitoskeleton neuron, yang esensial bagi diferensiasi, pertumbuhan akson, serta pemeliharaan fungsi neuronal. Dalam penelitian in vitro, sel PC12 yang dipapar faktor pertumbuhan atau kondisi stimulasi tertentu akan meningkatkan ekspresi

β III-tubulin, yang menunjukkan bahwa sel tersebut sedang mengalami diferensiasi menuju fenotipe neuron matur. Dengan demikian, β III-tubulin dipandang sebagai marker yang sangat spesifik dan sensitif untuk mengidentifikasi proses regenerasi dan diferensiasi neuronal (Katsetos et al., 2003).

Lebih jauh, mekanisme molekuler yang menghubungkan stimulasi eksternal, seperti paparan dekstroza, dengan perubahan ekspresi protein struktural maupun fungsional seringkali dimediasi oleh jalur sinyal intraseluler. Salah satu jalur utama yang terlibat adalah MAPK/ERK pathway, di mana p-ERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase) merupakan bentuk aktif dari protein ERK. Aktivasi p-ERK terjadi ketika sel menerima sinyal pertumbuhan, stres, atau stimulasi faktor regeneratif, yang kemudian menginisiasi proses transkripsi gen terkait proliferasi, migrasi, dan diferensiasi. Pada sel saraf PC12, aktivasi p-ERK terbukti esensial dalam proses diferensiasi neuronal, termasuk pertumbuhan neurit dan pembentukan sinaps (Sweatt, 2001).

Secara keseluruhan, kedua marker ini saling melengkapi dalam memantau efek proliterapi dekstroza secara in vitro. β III-tubulin menunjukkan kapasitas diferensiasi neuronal, sedangkan p-ERK menjadi indikator awal aktivasi jalur regeneratif yang mendasari kedua proses tersebut. Dengan demikian, pengukuran ketiganya dapat memberikan gambaran komprehensif mengenai sejauh mana dekstroza pada konsentrasi tertentu mampu menstimulasi respons regeneratif pada model sel saraf (PC12).

Pilihan konsentrasi dekstroza pada penelitian proliterapi in-vitro menentukan dua fenomena utama: (1) stimulasi jalur pro-regeneratif (mis. sekresi growth factor, aktivasi MAPK/ERK) yang dapat meningkatkan ekspresi protein regeneratif, dan (2) stres osmotik/sitotoksitas bila konsentrasi terlalu tinggi yang justru menurunkan viabilitas dan menekan ekspresi protein fungsional. Hubungan ini bersifat dose-dependent dan juga tipe-sel-spesifik, C2C12 (myoblast) dan PC12 (model neuron) merespons secara berbeda terhadap hiperosmolaritas dan paparan glukosa tinggi. Bukti literatur (in-vitro & ulasan) mendukung bahwa rentang konsentrasi proliterapi klinik ($\approx 10\text{--}15\%$) dapat memicu efek pro-remodeling pada jaringan penunjang tetapi juga bisa menimbulkan stres seluler yang nyata pada kultur—terutama pada sel neuronal (Karasimav, Ö., 2023)

Berikut Mekanisme dasar yang menghubungkan dosis dengan ekspresi protein

1. **Hiperosmolaritas & stres seluler**

Larutan dekstrosa hipertonik meningkatkan osmolalitas mikro-lingkungan seluler. Pada tingkat sedang, stres osmotik memicu jalur sinyal yang mengarahkan pelepasan cytokine/factor pertumbuhan (contoh: TGF- β , PDGF) dan rekrutmen/aktivasi fibroblas → berujung pada sintesis matriks (mis. kolagen). Namun pada tingkat tinggi, hiperosmolaritas merusak

integritas membran, mitokondria, dan organel lain sehingga memicu apoptosis/nekrosis yang menurunkan kapasitas sel untuk mensintesis protein regeneratif. Studi in-vitro pada fibroblas & garis sel lain menunjukkan peningkatan morfologi apoptotik dan penurunan viabilitas pada konsentrasi dextrose yang tinggi (Güran, Ş., et al., 2018)

2. **Aktivasi jalur MAPK/ERK (p-ERK) sebagai mediator awal**

MAPK/ERK adalah jalur kunci yang menghubungkan stimulus eksternal (stres, growth factor) dengan respons prolifерatif/diferensiasi. Fosforilasi ERK (p-ERK) bertindak sebagai switch yang mendorong transkripsi gen-gen prolifерasi dan diferensiasi. Pada paparan hiperosmolar ringan–sedang, p-ERK sering meningkat sebagai respon adaptif dan pro- survival, memfasilitasi prolifерasi sebelum masuk fase diferensiasi; bila stres berlanjut dan intensitasnya terlalu tinggi, aktivasi adaptif ini dapat digantikan oleh sinyal pro-apoptotik. Oleh karena itu pola p-ERK dapat berfungsi sebagai indikator apakah perlakuan dekstrosa

memicu jalur regeneratif (p-ERK ↑) atau menuju kerusakan sel (p-ERK mungkin sementara

↑ kemudian turun dengan aktivasi caspase) (Zhao, A.T., et al., 2022.)

3. **Diferensiasi & ekspresi protein spesifik (p-ERK & β III-tubulin)**

- *β III-tubulin*: sebagai marker diferensiasi neuronal, *β III-tubulin* meningkat saat PC12 beralih ke fenotipe neurit-membentuk. Neuron lebih sensitif terhadap stres

glukosa/

hiperosmolar—pada konsentrasi tinggi (kira-kira $\geq 12,5$ –15% pada paparan langsung) dapat terlihat penurunan viabilitas dan apoptosis sehingga ekspresi β III-tubulin menurun karena sel kehilangan kapasitas diferensiasi atau mati (Dohl, J., et al., 2018.). Kontrol positif (mis. NGF) digunakan untuk menandai peningkatan β III-tubulin saat kondisi kondusif (Benazzoug, Y., et al., 1998). β III-tubulin adalah isoform tubulin yang secara spesifik diekspresikan pada neuron. Protein ini merupakan komponen utama sitoskeleton mikrotubulus, yang berperan penting dalam pembentukan dan pemanjangan neurit. Ekspresi β III-tubulin digunakan secara luas sebagai penanda diferensiasi neuronal pada kultur sel maupun jaringan (Katsetos et al., 2003). Peningkatan ekspresi β III-tubulin pada sel PC12 setelah perlakuan dekstroza akan mengindikasikan peran dekstroza dalam mendorong diferensiasi dan pembentukan struktur neuron. Dalam konteks penelitian in vitro, β III-tubulin digunakan sebagai penanda diferensiasi neuronal. Peningkatan ekspresinya pada sel PC12 setelah perlakuan tertentu, misalnya dekstroza, dapat mengindikasikan bahwa sel mengalami transisi menuju fenotipe neuronal yang lebih matang. Hal ini penting karena diferensiasi neuronal merupakan salah satu aspek kunci dalam regenerasi saraf setelah cedera. Selain itu, β III-tubulin juga terlibat dalam pertumbuhan neurit, yaitu perpanjangan sitoplasmik yang kelak akan berkembang menjadi akson atau dendrit. Proses ini menjadi indikator utama kemampuan neuron untuk membentuk koneksi baru, yang krusial dalam pemulihan fungsi saraf pasca trauma atau dalam kondisi nyeri neuropatik (Mollinari et al., 2002).

- p-ERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase)

ERK adalah bagian dari jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK), yang berperan dalam transduksi sinyal dari permukaan sel ke inti untuk mengatur proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel. Bentuk aktifnya, p-ERK, diketahui terlibat dalam plasticitas sinaptik, pertumbuhan neurit, dan neuroregenerasi (Subramaniam & Unsicker, 2010). Pada neuron, aktivasi p-ERK diketahui memegang peran penting dalam neuroplastisitas dan neuroregenerasi (Subramaniam & Unsicker, 2010). Dalam penelitian sel PC12, peningkatan p-ERK sering diasosiasikan dengan diferensiasi neuronal yang dipicu oleh faktor

pertumbuhan, seperti nerve growth factor (NGF). Aktivasi jalur ini mendorong pembentukan dan pemanjangan neurit, serta meningkatkan kemampuan neuron untuk bertahan hidup pada kondisi stres oksidatif atau cedera (Greene & Tischler, 1976; Cowley et al.,

1994). Relevansinya terhadap proliterasi dengan dekstrosa adalah bahwa stimulasi konsentrasi dekstrosa tertentu mungkin mengaktifkan p-ERK, sehingga memicu proses regenerasi neuron melalui mekanisme pensinyalan molekuler. Dengan demikian, analisis ekspresi p-ERK dalam penelitian ini akan memberikan gambaran apakah dekstrosa mampu menginduksi jalur regeneratif yang mendukung pemulihan fungsi saraf.

- Keduanya saling melengkapi: peningkatan β III-tubulin menunjukkan adanya perubahan fenotipe neuronal secara struktural, sementara aktivasi p-ERK menunjukkan adanya respons molekuler yang mendasari perubahan tersebut. Oleh

karena itu, kombinasi kedua marker ini sangat relevan untuk menilai efektivitas konsentrasi dekstrosa (5%, 10%, 12,5%) dalam merangsang regenerasi saraf secara in vitro pada sel PC12.

