

The Ethanol Extract of Croton Seed Inhibits the Oral Pathogen, *Streptococcus mutans*

Ji-Hee Kim¹, Sam-Sung Jung¹, Chung-Hoon Kang¹, Yong-Ouk You^{1,*} and Kang-Ju Kim^{2,*}

¹Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea

²Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea

(received February 14 2018; revised March 5, 2018; accepted March 16, 2018)

It is noted that *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) triggers dental caries establishment by two major factors: the synthesis of organic acids, which demineralize dental enamel, and the synthesis of glucans, which mediate the attachment of bacteria to the tooth surface. Therefore, it is noted that the development of a more effective, substantial and safe preventive agent that works against dental caries and periodontal disease is required at this time. For this reason, the present study was designed to investigate the effect of croton seed ethanol extracts on the growth, acid production, adhesion, and insoluble glucan synthesis of *S. mutans*. In this case, the ethanol extract of croton seed showed concentration dependent inhibitory activity against the growth, acid production and adhesion of *S. mutans*. Especially, it is important to note that it has produced

significant inhibition at the concentration of 0.1 and 0.2 mg/ml as compared to the control group. Moreover, these results suggest that the application of croton seed extract may be considered to be a useful method for the prevention of dental caries.

Key words: Croton seed, *Streptococcus mutans*, Dental Caries, Adhesion, Glucan

*Correspondence to: Kang-Ju Kim, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea
Tel: 063-850-6858, Fax: 063-850-7157
E-mail: kjkimom@wku.ac.kr
ORCID : 0000-0001-6525-3744

*Correspondence to: Yong-Ouk You, Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea
Tel: 063-850-6944, Fax: 063-850-7157
E-mail: hope7788@wku.ac.kr
ORCID : 0000-0002-7754-3033

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치아우식증은 사람에게 유병률이 높은 만성질환으로, 우리나라의 건강보험심사평가원에서 2016년 외래 다빈도 상병 순위를 보면 치아우식증이 6위를 차지하였고, 치아우식을 치료하기 위해 지불되는 보험비용부담 뿐만 아니라 더 나아가 사회적 비용부담으로 가중되고 있는 실정이다[1]. 최근 WHO보고에 따르면 전 세계 성인의 60%가 치아우식과 관련된 구강질환을 겪고 있다고 보고하여 전세계적으로 치아우식증으로 인한 고통이 지속되고 있음을 나타내고 있다[2,3].

치아우식증은 구강내 세균에 의한 감염성 질환 중 하나로 그 중 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 대표적인 치아우식증 원인균 이다[4,5]. *S. mutans*는 섭취한 음식물의 탄수화물을 분해함으로써 당대사를 통해 유기산을 생성하고 치태 형성에 기여하는 불용성의 다당류를 합성한다. 생성된 유기산에 의해 치아 표면에 화학적 탈회 가 일어나서 우식이 발생한다[6,7].

치아우식증으로 인한 환자들의 고통을 제거하기 위해

치아우식을 예방할 수 있는 효과적이고 안정성이 있는 치아우식 예방법의 개발이 필요하다. 치아우식증을 예방하기 위한 기존 방법으로는 클로르헥시딘 등의 합성화합물들로 항균효능은 우수하나 치아착색, 치석형성, 구강점막의 박리현상과 같은 부작용을 초래한다[8]. 부작용을 미연에 방지하기 위해 안정성이 높은 천연물에서 추출한 항균물질에 관심이 높아지고 있다[9].

과두(croton seed)는 벚들웃과(Euphorbiaceae)에 속한 과두나무의 여문 씨를 말린 것이나 성숙한 과실로서 과거로부터 천연약물로서 사용되어왔다[10]. 문헌에 따르면과두는 설사와 위염, 소화불량, 장염 등의 소화기관 질환과 심한 부종 등에 쓰여 왔고, 살충의 효능이 있는 약물로 알려져 있으며, 또한 급성 복통, 만성변비, 호흡곤란, 월경통, 급성인후염, 폐 농양에 의한 객담 등의 질환에 사용되었고, 치질, 염증과 부종, 피부염 등에도 효능이 있는 것으로 알려져 있다[11]. 과두는 위장운동 촉진 작용, 세포분화 촉진 작용, 세포증식 억제작용을 나타내며[12], *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 항균능이 있다고 보고된 바 있다[13]. 동의보감에 있는 과두에 대한 내용을 살펴보면, 과두는 치아우식증의 진행으로 발생한 치통의 증세를 치료하는데 효능이 탁월하여 치아우식증을 억제할 수 있는 효능이 있을 것으로 추정되지만, 아직 과학적인 연구는 미진한 상태이다[14].

본 연구에서는 과두의 에탄올 추출물이 치면세균막 형성의 원인균인 *S. mutans*의 성장과 산 생성을 억제하는 효과, saliva-coated hydroxyapatite bead (S-HA) 부착 억제에 미치는 효과, Glucosyltransferase (GTFase)에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료의 준비

실험에 사용된 과두는 국내산으로 원광대학교 대학한약국에서 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 건조된 과두 1 kg에 70% ethanol 4 L를 첨가하여 상온에서 3일간 2회 반복 침출하였으며 추출한 후 여과지(Whatman filter paper, USA)로 여과하여 여과액을 감압 농축하였다. 농축된 과두의 에탄올 추출물은 195 g (추출 수율 19.5%)을 얻었으며 이후 -20°C로 냉동보관하여 실험에 사용하였다.

균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

ATCC 25175로 brain heart infusion (BHI, Difco Laboratories, USA) 액체배지에 1-2차 계대배양 후 같은 배지에 식균하여 37°C의 배양기에서 24시간 동안 배양하여 사용하였다.

*S. mutans*의 성장과 산생성 억제 검사

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 과두의 에탄올 추출물을 처리한 후 균을 5×10^5 CFU/ml이 되게 접종하였다. 37°C의 배양기에서 24시간 배양한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 과두 에탄올 추출물이 *S. mutans* 성장 억제 효과에 미치는 영향을 관찰하였으며, pH meter (HANNA instrument, philippines)를 이용하여 pH를 측정하였고 유기산 생성 억제 효과를 관찰하였다. 대조군은 과두 추출물을 넣지 않고 시행하였다.

*S. mutans*의 hydroxyapatite bead(HA) 부착 억제 검사

Hydroxyapatite bead의 부착검사는 Gaines[15]의 방법을 변형하여 실험하였다. hydroxyapatite beads (Bio-Rad Lab. U.S.A.) 30 mg을 수세하여 건조시킨 후 1 ml의 타액으로 37°C에서 1시간 동안 처리하여 bead에 타액을 코팅시켰다. 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) 로 3회 수세하여 BHI 액체배지에 각 농도별 과두추출물을 단계적으로 처리하였고 *S. mutans*가 1×10^6 CFU/ml이 되게 접종하였다. 흔들리는 배양기에서 37°C, 90분 동안 S-HA에 부착시킨 후 0.1 M PBS로 3회 수세하였다. 30초 동안 50W로 초음파를 가하였고 균체를 수집한 현탁액을 단계적으로 희석하였다. 현탁액을 Mitis Salivarius Bacitracin Agar (MSBA, Difco Laboratories, USA) 배지에 분주하고 도말하여 37°C 배양기에서 24-48시간동안 배양시켰고 배양된 균의 집락수를 세고 그 결과를 산출하였다.

Glucosyltransferase (GTFase)의 준비

2L의 BHI 액체배지에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양한 후, 4°C에서 15,000 rpm으로 20분동안 원심분리하여 상층액을 취하고 60-70% ammonium sulfate를 넣은 후 같은 조건으로 원심분리 하여 단백질을 침전시켰다. 0.1 M KPB (pH 6.0)을 4시간마다 교체하였으며, 4°C에서 24시간동안 투석 후 냉동보관(-80°C) 하였다가 사용하였다.

GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제능 검사

과두의 에탄올 추출물이 *S. mutans*가 GTFase을 생성하여 이 효소가 glucan을 합성하는 대사에 관여하는 영향을 조사하기 위해 기존 방법을 이용하여 *S. mutans*의 글루칸 합성 억제능을 측정하였다[16].

0.04% sodium azide를 첨가한 0.4 M KPB (pH 6.0)에

0.25 ml의 0.4 M 자당용액과 0.25 ml의 각 농도별로 파두 에탄올 추출물을 처리하였고, GTFase를 첨가하여 최종 1 ml이 되게 하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 증류수로 수세하여 글루칸을 떼어내기 위하여 4초동안 40W로 초음파를 처리하였다. 5% phenol을 1 ml, H₂SO₄를 5 ml 첨가하여 30분간 반응시켰고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 에탄올추출물을 넣지 않은 군을 대조군으로 하였다.

정성실험을 통한 파두의 성분 검사

파두의 성분을 알아내기 위해 기존 방법을 이용하였다[17]. Alkaloid는 Mayer's 시약으로, Phenolics (flavonoid, tannin)는 Ferric chloride 시약으로, Glycosides (탄수화물 배당체)는 Molish 실험으로, Peptide는 Biuret 시약으로, Flavonoid는 Mg-HCl 시약으로, Steroid, terpenoid, saponin는 Liebermann-Burchard 시약으로, Organic acid는 silver nitrate 시약으로 정성분석을 하였다.

통계 분석

실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험군)/대조군]×100의 식을 이용하여 산출하였다. 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS(ver 10.0)를 사용하여, 평균과 표준오차로 제시하였으며, α=0.05 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 independent sample t-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

파두 에탄올 추출물의 *S. mutans* 성장에 관한 억제 효과

파두 에탄올 추출물로 *S. mutans*에 대한 항균 활성 실험을 한 결과는 Fig. 1과 같다. 파두 에탄올 추출물을 처리하지 않은 대조군에서 0.202±0.009 흡광도를 나타내었고, 파두 에탄올 추출물은 0.025 mg/ml 농도에서 0.177±0.005, 0.05 mg/ml 농도에서 0.143±0.003, 0.1 mg/ml 농도에서 0.000±0.001, 0.2 mg/ml 농도에서 0.000±0.001을 나타내 대조군과 비교하여 각각 12%, 29%, 100%, 100%의 *S. mutans* 성장에 대한 억제 효능을 보였다. 파두 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 현저한 차이를 나타냈으며, 0.1 mg/ml 이상 농도에서 유의한 차이를 나타내었다 (p<0.05).

파두 에탄올 추출물의 *S. mutans* 유기산 생성에 관한 억제효과

*S. mutans*에 의한 유기산을 생성하는 대사활동에 파두

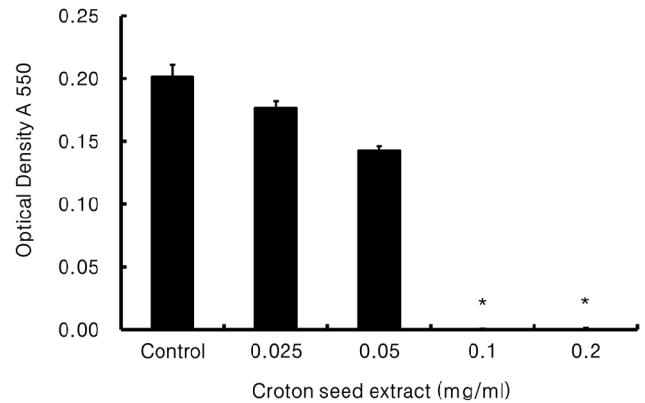


Fig. 1. The optical density of *S. mutans* by various concentrations of ethanol extract of croton seed. The optical density of A₅₅₀ were read by a spectrophotometer. *p<0.05 was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

Table 1. The pH of *S. mutans* by the various concentrations of ethanol extract of croton seed.

Conc. (mg/ml)	pH
Control	5.15±0.04 ¹⁾
0.025	5.17±0.03
0.050	5.18±0.04
0.100	7.15±0.03*
0.200	7.21±0.00*

¹⁾ Value represent the Mean±SE obtained from triplicate experiment *p<0.05 was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

의 에탄올 추출물의 저해 활동 효능을 탐색하기 위하여 *S. mutans*의 유기산 생성량을 pH meter기로 측정한 결과는 Table 1과 같다. 파두 에탄올 추출물을 처리하지 않은 대조군에서 pH 5.15±0.04을 나타내었으며, 파두의 에탄올 추출물을 처리한 0.025 mg/ml에서는 5.17±0.03, 0.05 mg/ml에서 5.18±0.04, 0.1 mg/ml에서 7.15±0.03, 0.2 mg/ml에서 7.21±0.00를 나타내었다. 파두 에탄올 추출물이 0.1 mg/ml 이상에서 우식 임계 pH 5.5보다 높아 대조군과는 현저하게 유의한 차이를 나타내었다(p<0.05).

파두 에탄올 추출물의 S-HA 부착 억제에 관한 효과

파두의 에탄올 추출물로 *S. mutans*균이 hydroxyapatite bead(HA)에 부착능을 억제하는 데 효과가 있는지 조사한 결과(Fig. 2), 파두 에탄올 추출물을 처리하지 않은 대조군은 850±35.4 (×10⁴) CFU/ml로 높은 균수가 검출되었다. 반면 파두 에탄올 추출물을 가한 처리군에서는 0.025 mg/ml에서 716±370.2 (×10⁴) CFU/ml, 0.05 mg/ml에서 730±220.7 (×10⁴) CFU/ml, 0.1 mg/ml에서 570±83.8 (×10⁴)

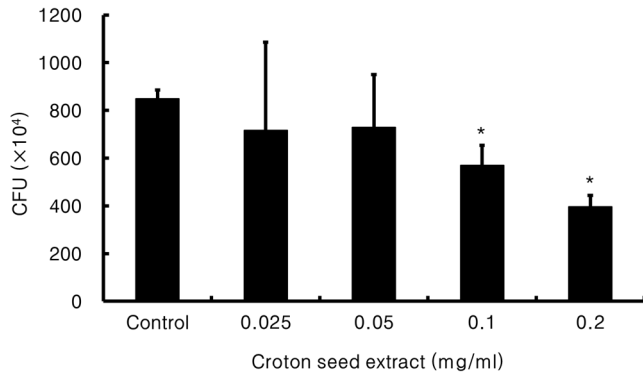


Fig. 2. The colony forming unit (CFU) of *S. mutans* to the 30 mg saliva-coated hydroxyapatite beads by various concentrations of ethanol extract of croton seed. * $p < 0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

CFU/ml, 0.2 mg/ml에서 $397 \pm 46.2 (\times 10^4)$ CFU/ml로 나타나어 대조군을 기준으로 부착율을 산출하였을 때 각각 16%, 14%, 33%, 53%의 억제율을 보였다. 특히 0.2 mg/ml에서 대조군에 비해 부착된 균수가 유의한 차이로 감소하였다($p < 0.01$).

파두 에탄올 추출물의 GTase에 의한 비수용성 글루칸 합성 저해활성에 관한 효과

GTase에 의해 비수용성 글루칸 정량 실험을 통해 파두 에탄올 추출물의 첨가가 미치는 영향을 조사하여 비수용성 글루칸 합성 생성율을 산출한 결과는 Fig. 3과 같다. 파두 에탄올 추출물을 첨가 하지 않은 대조군을 기준으로 파두 에탄올 추출물을 첨가한 군인 0.025mg/ml에서 $221.2 \pm 7.3 \%$, 0.05mg/ml에서 $251.5 \pm 5.8 \%$, 0.1mg/ml에서 $212.1 \pm 7.6 \%$, 0.2mg/ml에서 $230.3 \pm 20.7 \%$ 로 비수용성 글루칸 생성율을 보여, 파두 추출물이 비수용성 글루칸 합성을 저해하는 효과가 없음을 나타냈다.

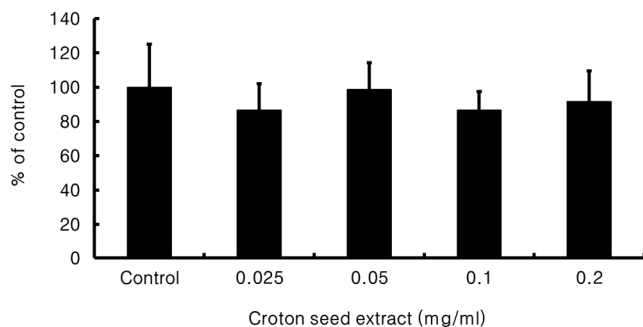


Fig. 3. Rate of insoluble glucan synthesis of *S. mutans* by the various concentration of ethanol extract of croton seed. * $p < 0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

정성실험을 통한 파두의 성분 검사

기존에 alkaloids, flavonoids, terphenoids 등이 항균능을 지닌 성분으로 알려져 있어 7가지 성분의 검출반응 검사를 거쳐 파두의 성분을 알아본 결과는 Table 2와 같다. 파두에는 Phenolic compounds, Glycosides, Peptides, Steroids, Terphenoids, Organic acids 등이 포함되었고, Alkaloids, Flavonoids는 포함되지 않은 것으로 나타났다. 그중 Glycosides는 반응이 비교적 현저하여 해당성분을 상당량 함유하였다고 추정된다.

Table 2. Phytochemical analysis of croton seed extract.

Plant constituent	Ethanol extract
Alkaloids	-
Phenolic compound	+
Glycosides	+++
Peptides	++
Flavonoids	-
Steroids, terpenoids	++
Organic acids	++

+++ strong, ++ medium, + poor presence, - absence

고찰

구강 내 질환은 구강 내에 상주하는 세균으로 인해 발생한다[18]. *Mutans streptococci*와 *lactobacilli*에 의해 치아우식이 유발되며, 주요 원인균으로는 *mutans streptococci*에 속하는 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 알려져 있다[19, 20]. 이 세균들은 치아표면에서 치면세균막(dental plaque)을 생성하고, 주변부로는 물리화학적인 변화가 일어나 또 다른 세균군들의 증식을 유도한다[21]. 치면의 획득피막 부위에 초기 부착하는 균인 *S. mutans*는 glucoyltransferase와 frutosyltransferase 등 당 전이효소를 생산하고 이들 효소의 대사 활동에 의해 당류로부터 점성이 있는 비수용성 글루칸을 합성한다[21,22]. 합성된 비수용성 글루칸은 치면에서 증식하고 있는 *S. mutans*를 포함한 다른 세균들간의 결합을 증대시키며, 치면에서 증식한 세균군들이 치면을 덮으면 치면세균막이 된다. 치면세균막을 구성하는 *S. mutans*가 섭취한 음식물로부터 당을 분해하여 유기산을 생성하면 치면에 있는 세균막 내부에 축적하게 되고 pH가 낮아진다. 이어서 치아의 무기질이 용해가 진행되어 치아우식증에 도달하게 된다[22].

최근 이러한 다인 감염성 질환에 대하여 항 치아우식 활성능을 연구를 위해 *S. mutans* 병원체에 대한 항균 활성능, GTase 활성 억제능, 세균 부착 억제능, 유기

산 생성 억제능 등에 효능이 있는 천연물질의 조사가 활발히 이루어지고 있다[23-25].

본 연구에서는 파두의 에탄올 추출물을 처리하여 *S. mutans*를 대상으로 균 성장과 유기산 생성 억제 효과를 확인하였고, S-HA에 부착능 저해 효과, 비수용성 글루칸 합성을 억제하는지를 측정하였다.

파두 에탄올 추출물의 처리 농도가 높을수록 *S. mutans* 성장과 균체의 산물인 유기산을 생성하는 데 억제하는 효과가 증가하는 것으로 나타났고 특히 0.1 mg/ml은 *S. mutans*의 생육을 억제하는 데 필요한 항치아 우식 물질의 최소저해 농도로 대조군의 상대적인 균 성장 억제율이 약 100%에 달하였다. 항치아우식성 물질인 파두 에탄올 추출물이 0.1 mg/ml 이상의 농도에서 치아 우식을 유발하는 세균의 성장을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

사람의 타액 내에는 약 500종의 세균이 존재하여 구강감염질환의 개시나 진행에 중요한 역할을 한다[26]. 또한 치아우식 원인균인 *S. mutans*가 타액과 치면세균막에 다량 존재할수록 우식유병율은 더욱 높아진다[27].

타액 내 치아표면의 *S. mutans* 부착 억제 효과를 확인한 결과, *S. mutans* 부착 억제율이 파두 에탄올 추출물 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml에서 16%, 14%, 33%, 53%로 추출물의 첨가가 상승하면서 치아우식원인균의 부착 억제율도 같이 증가되었음을 확인하였다. 0.2 mg/ml에서 대조군과 유의한 차이를 보여 ($p < 0.01$), 50% 이상 억제효과가 있었다.

*S. mutans*가 자당을 분해하여 glucoyltransferase 생성하고 합성된 글루칸은 수용성인 텍스트란과 비수용성인 뮤탄으로 구분한다. 수용성 글루칸은 치면세균막으로 확산되어 치면 세균막의 에너지원으로 이용되며, 비수용성 글루칸은 치면세균막의 골조역할을 한다[28]. 비수용성 글루칸 생성 억제율을 확인한 결과, 파두 에탄올 추출물을 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml 로 첨가한 군은 대조군에 비해 각각 $221.2 \pm 7.3\%$, $251.5 \pm 5.8\%$, $212.1 \pm 7.6\%$, $230.3 \pm 20.7\%$ 의 생성율을 보여, 파두 에탄올 추출물이 비수용성 글루칸 합성을 저해하는 데 효과가 없다고 나타났다.

식물에서 항균물질은 alkaloid류, flavonoid류, terpenoid류, phenolic compound류, quinone류 및 volatile oil 등 2차 대사산물로 알려져 있다[29]. 파두의 성분을 검사한 결과, 파두에는 phenolic compounds, glycosides, peptides, steroids, terphenoids 및 organic acids 등이 포함되었고, 그 중 glycosides는 반응이 비교적 현저한 것으로 보아 상당량이 포함되어있다고 추정된다. Glycosides는 당과 다른 화합물이 결합되어 여러가지 약리효능을 함유한 물

질들이 많고, terpenes는 항산화능과 항균능을 보유하고 보고된 바 있다[29]. Phenolic compounds는 분자 내 수산기가 미생물의 세포막과 결합하여 구조를 붕괴시키고, 세균 내 주요 성분의 용출을 유도한 것으로 알려져 있다[30]. 파두의 성분은 대부분이 glycosides로 당과 결합된 항균효능을 함유한 물질들이 포진하였을 것으로 유추되고, glycosides뿐 아니라 phenolic compounds과 terpenoids가 파두의 *S. mutans*에 대한 항균 활성에 기여를 한 것으로 보인다.

이상의 연구결과를 토대로 보면, 파두의 에탄올 추출물은 *S. mutans*의 항균 활성과 치면 부착능을 저해하는데 관여하며 항 치아 우식 효능을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this paper.

Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (No. 2015R1D1A3A03016325).

References

1. Health insurance review & assessment service, Health insurance statistics index, Seoul, Health insurance review & assessment service, 2016.
2. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol. 2003;1:3-23. doi:10.1046/j..2003.com122.x
3. Petersen PE. Challenges to improvement of oral health in the 21st century-the approach of the WHO Global Oral Health programme. Int Dent J. 2004;54:329-343. doi:10.1111/j.1875-595X.2004.tb00009.x
4. Kim JB. Introduction to public oral health. Seoul, Komoonsa. Co. 2004.
5. Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol. 1998;13:195-216. doi:10.1111/j.1399-302X.1998.tb00698.x
6. Lee KS, Park JS, Lee HY. Dental microbiology. Iksan,

- Daehaksa. Co. 2004 pp 5-7
7. Mosci F, Perito S, Bassa S, Capuano A. The role of *Streptococcus mutans* in human caries. *Minerva Stomatol.* 1990;39:413-429.
 8. Scheie AA. Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than chlorhexidine. *J Dent Res.* 1989;68:1609-1616.
 9. Kim SY, Kim HN, Jun EJ, Kim JB, Jeong SH. The growth inhibitory effect of some vegetable oils on *streptococcus mutans* and *lactobacillus casei*. *Journal of Korean Academy of Oral Health.* 2016;40:24-30. doi:http://dx.doi.org/10.11149/jkaoh.2016.40.1.24
 10. Sung NK, Lee GI, Sae YB. The effect of croton seeds on tumor cell growth inhibition from mice. *DAEJEON University Institute of oriental medicine. Korean journal of oriental medicine* 1995:199-210.
 11. Sae BI, Lee ES. A Philological Study on poisoning of Crotonis Semen. *The society of applied oriental medicine.* 2003;3:49-63.
 12. Kim HC. *Korean medicine pharmacology.* Seoul, Jipmoondang. Co. 2001:183-184
 13. Bayor MT, Gbedema SY, Annan K. The antimicrobial activity of *Croton membranaceus*, a species used in formulations for measles in Ghana. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy.* 2009;1:47-51.
 14. Choi CR. *wan-yeog dong-uibogam oehyeongpyeon.* Seoul, Prunsasang. Co. 2003:262-265.
 15. Han MD, Lee JW, Ra SJ, Lee ES, Jeon ES. Chemical properties of *Streptococcus mutans* KCTC 3026 polysaccharide purified by fractions. *J Kor Acad Dent Health* 2000;24:259-270.
 16. You HH, Kim YH, Lee JS, Lee KH, So HS, Jeon BH, You OY. Effects of ethanol extract of *Saussurea lappa* on the growth, acid production, adhesion, and insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2005;19:1195-1199.
 17. Kang SY, An SY, Lee MW, Kwon SK, Lee DH, Jeon BH, Kim KJ, You OY. Effects of *Aconitum Koreanum* extract on the growth, acid production, adhesion and insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *J Physiol & Pathol Korean Med* 2015;29:27-32. doi:10.15188/kjopp.2015.02.29.1.27
 18. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes and Infection.* 2000;2:1599-1607. doi:https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01316-2
 19. Takanobu M, Michiko M, Sachiko K. Mutans streptococci, lactobacilli in saliva and acidity from organisms in dental plaque: changes after restorative treatment. *The Journal of clinical pediatric dentistry.* 2004;28:327-332. doi:https://doi.org/10.17796/jcpd.28.4.bx254ru7w4146176
 20. Hamada S, Slade HD. Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980;44:331-384.
 21. Lemos JA, Quivey RG Jr, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new gram-positive paradigm? *Microbiology.* 2013;159:436-445. doi:10.1099/mic.0.066134-0
 22. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5:65-71. doi:10.3389/fcimb.2015.00010
 23. Kim KH, Han SR, Kim BI, Jung SH, Oh TJ. Antimicrobial activities of *Ramaria botrytis* (Fr.) against oral bacteria. *Journal of Korean society of dental hygiene.* 2017;17: 493-504. doi:https://doi.org/10.13065/jksdh.2017.17.03.493
 24. Kim MS, Lee KW, Park EJ. Antimicrobial activity of lavender and rosemary essential oil Nanoemulsions. *Korean J Food Cook Sci.* 2017;33:256~263. doi:10.9724/kfcs.2017.33.3.256
 25. Kim SY, Kim HN, Jun EJ, Kim JB, Jeong SH. The growth inhibitory effect of some vegetable oils on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Korean Academy of Oral Health.* 2016;40:24-30.
 26. Hong MH. Study on detection of oral bacteria in the saliva and risk factors of adults. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society.* 2014;15:5675-5682. doi:10.5762/KAIS.2014.15.9.5675
 27. Lee MJ. The comparison of the characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from caries free and high caries children[Doctor's thesis] Chonju: Univ. of Chonbuk. 2014.
 28. Lee YE, Lee HS, Song KB. The differential sucrose-dependent cariogenic traits of *Streptococcus mutans* in the presence of dietary carbohydrates. *Journal of Korean Academy of Oral Health.* 2011;35:251-257.
 29. Lee HW, Lee PRHN, Kwon HJ, Han KI, Han MD. Antimicrobial activity of extracts from some traditional oriental medicinal plants against dental caries bacteria. *J Dent Hyg Sci.* 2013;13:45-52.
 30. Gyawali R, Ibrahim SA. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.* 2014;46:412-429. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047