

산약(*Disocorea batatas*) 에탄올추출물의 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 항균능과 성장억제 효과

윤현서^{1,3} · 박충무^{2,3†}

¹동의대학교 치위생학과 교수, ²동의대학교 임상병리학과 교수, ³동의대학교 기능성 소재연구소

Antibacterial Effect of *Dioscorea Batatas* Ethanol Extract Against *L. gasseri*, *S. mutans* and *P. gingivalis*

Hyun-Seo Yoon, Ph.D^{1,3} · Chung-Mu Park, Ph.D^{2,3†}

¹*Dept. of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Professor*

^{2†}*Dept. of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Professor*

³*The Research Institute Health for Functional Material, Dong-Eui University*

Abstract

Purpose : In this study, to prove the antibacterial effect of *Disocorea batatas*, which is widely used for food, and to confirm the growth inhibitory effect, the antibacterial activity against *L. gasseri*, *S. mutans*, and *P. gingivalis* was verified. Based on this, it is intended to verify the utility as a preventive and therapeutic composition for dental caries and periodontal disease.

Methods : RAW 264.7 cells were used to verify the cell survival rate and NO (Nitric Oxide) inhibitory effect on *Disocorea batatas* ethanol extract (DBEE). In order to verify the antibacterial effect against *L. gasseri*, *S. mutans*, and *P. gingivalis*, concentrations of 125, 250, and 500 mg/ml of DBEE were used and measured by the disk diffusion method. In order to confirm the growth inhibitory effect, the absorbance was measured at 600 nm at 3, 6, 12, 18, and 24 hours using the liquid medium dilution method, and the growth inhibitory effect was measured compared to the control group.

Results : The cell viability for DBEE was 91 % at 50 mg/ml, and there was no cytotoxicity. The NO production inhibitory effect was shown from 10 μ g/ml, and the higher the concentration, the greater the inhibitory effect. As for the antimicrobial effect using the disk diffusion method, the higher the concentration, the higher the antibacterial effect. At 125 mg/ml and 250 mg/ml, *S. mutans* and *L. gasseri* showed high antimicrobial activity, and at 500 mg/ml, the antibacterial effect was higher in *L. gasseri*. The growth inhibitory effect in DBEE was concentration-dependent as the higher the concentration, the higher the growth inhibitory effect, and all of them began to show growth inhibitory effects from 6 hours.

Conclusion : Considering that it is widely used as an edible and medicinal material, *Disocorea batatas* has shown the potential to be used as a substance to prevent and alleviate dental caries and periodontal diseases, and it is believed that further research can be applied to oral health care products.

Key Words : antibacterial, *disocorea batatas*, *L. gasseri*, *P. gingivalis*, *S. mutans*

† 교신저자 : 박충무, cmpark@deu.ac.kr

제출일 : 2023년 4월 16일 | 수정일 : 2023년 5월 6일 | 게재승인일 : 2023년 5월 19일

I. 서론

1. 연구의 배경 및 필요성

우리나라에서 양대구강병은 치아우식증과 치주질환으로 이를 예방하기 위하여 스케일링과 치면열구전색, 불소도포 등 다양한 처치를 하고 다양한 구강보건교육 사업도 시행 중이다(Eom 등, 2021). 그러나 외래 다빈도 상병 통계를 보면 2010년 치은염과 치주질환 3위, 치아우식증 7위, 치수 및 치근단주위조직의 질환 10위를 차지하였고, 10년이 지난 2021년 기준 치은염과 치주질환 1위, 치아우식증 4위, 치수 및 치근단주위조직의 질환 11위로 나타나 치아우식증과 치주질환 모두 지속적으로 증가하는 양상을 보이고 있다(Healthcare Bingdate Hub, 2023).

치아우식증의 대표 원인균은 *Streptococcus mutans*(S. mutans)로 당 대사를 통해 젖산을 생성시키고 이로 인해 pH가 낮아지며 치아에서 칼슘이 빠져나가게 된다(Hahn 등, 1991). 치아우식증을 예방하기 위해서는 치아 표면에 S. mutans가 부착되거나 집락을 형성하지 못하도록 하는 것이 중요하며 이는 치면세균막을 제거하는 것이다(Park 등, 2011). 치면세균막을 제거하는 방법은 물리적 요법과 화학적 요법으로 구분하며 물리적 요법의 가장 대표적인 것은 칫솔질이나 구강관리용품 사용하여 물리적 자극에 의해 제거하는 것이다(Kim 등, 2015). 화학적 요법으로는 소독약품을 이용하는 것으로 치과에서 현재 가장 많이 사용하고 있는 것이 Chlorhexidine 이다. Chlorhexidine은 항균 효과가 매우 좋은 장점을 가지고 있으나, 구강점막에 손상을 야기하고 치아 표면과 혀에 착색을 유발하며, 작열감과 통증을 동반하는 부작용이 있어 장시간 사용을 권장하지 않는다(James 등, 2017)

치주질환의 대표 원인균은 *Porphyromonas gingivalis*(P. gingivalis)로 치아 표면에 존재하며 당단백질 성분의 치면세균막의 형태로 이루어져 있다(Kim 등, 2017). 치면세균막은 오랜 시간 제거되지 못하고 축적되면 치아면에 치석(calculus)의 형태로 존재하면서 통증과 부종, 치은출혈을 야기시키며 증상을 방치할 경우 치아를 지지하고 있는 치조골이 서서히 흡수되며 치아의 동요를 유발시킨다(Hwang 등, 2015).

이러한 치주질환과 치아우식증의 대표적인 원인으로 이를 유발시키는 P. gingivalis와 S. mutans를 제거하기 위한 노력은 꾸준히 이루어지고 있으며(Han 등, 2016), 개인의 건강에 대한 관심 증가로 인하여 화학약품의 부작용에 대한 부담감이 증가하였다. 이로 인해 천연식물 중 대표 식물인 허브와 식용식물에 대한 관심이 증가하게 되었다(Pai 등, 2004).

천연추출물 중 치아우식증의 원인균인 S. mutans에 대한 항균력은 녹차추출물(You 등, 2022)과 박하추출물(Choi 등, 2020), 솔잎과 새싹보리(Kim 등, 2022), 황금과 소목(Lee 등, 2013) 등의 연구들이 이루어졌으며, 치주질환의 원인균인 P. gingivalis에 대한 항균 효과는 황기추출물(Choi 등, 2019), 레몬글라스추출물(Yoon & Park, 2023), 노각나무추출물(Kim 등, 2021) 등이 입증되었다.

산약(*Disocorea batatas*)은 우리나라에서 자생하는 다년생 덩굴 식물이며 한방에서는 약용으로 주로 사용되며, 기능으로는 식욕부진, 해수, 대하, 빈뇨 치료에 사용되었다(Yang 등, 2009). 또한 혈중콜레스테롤을 저하시키고, 항비만 효과, 항염증 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Lim 등, 2011). 다양한 효과성이 검증되었고 현재 식용으로 널리 사용되는 산약을 이용하여 치아우식증과 치주질환의 대표 원인균에 대한 항균 효과를 검증하고자 한다.

2. 연구의 목적

본 연구는 식용으로 널리 사용되고 있는 산약의 L. gasseri, S. mutans, P. gingivalis에 대한 항균 효과를 검증하고 성장억제 효과를 확인하기 확인함으로써 치아우식증과 치주질환의 예방 및 치료조성물로의 활용성을 검증하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험재료

산약 에탄올추출물은 천일한약방에서 건조 산약(국산)을 구입하여 건조된 시료 100 g을 분쇄 후 원물과 에

탄올을 1:4 (v/v)의 비율로 가해 초음파추출기(Powersonic 410, Hwashin Tech, Korea)로 30분간 추출한 후, 80 °C에서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 여과된 추출액은 진공농축기(N-110, Eyla Co., Tokyo, Japan)로 완전 농축하여 데시케이터에 24시간 보관 후 추출물 무게를 측정하였으며, 회수율은 3 %였다.

2. 연구방법

1) 실험균주

구강질환의 대표 원인균인 *Lactobacillus gasseri*(L. gasseri, KCTC 3163), *Streptococcus mutans*(S. mutans, KCTC 3065), *Porphyromonas gingivalis*(P. gingivalis, 5352), *Streptococcus mutans*(S. mutans, KCTC 3065)를 한국생명공학연구원 생물자원센터(Daejeon, Korea)에서 분양받았다. 균주는 brain heart infusion (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) broth 배지에 접종하여 37 °C shaking incubator (200x rpm, Daehan Lab. Science, Namyangju, Korea)에서 24시간 배양하여 사용하였다.

세포 생존율과 NO값을 알아보기 위해 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 RAW 264.7 cell을 분양 받아사용하였고, 10 % FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml)이 첨가된 DMEM 배지(Cytiva, Marlborough, MA, USA)를 사용하여 37 °C 에서 배양시켰다.

2) 세포 생존율

세포 생존율은 WST-1 시험법을 이용하였으며, RAW 264.7 cell을 96-well plate에 1×10^4 cells/well을 분주하여 24시간 배양하고 시료를 10, 25, 50, 100 mg/ml 농도로 처리하고, 24시간 경과 후 WST-1 용액(Daeil Lab. Science, Seoul, Korea)을 10 μl 첨가하고 4시간 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군 대비 백분율로 나타내었다.

3) NO(Nitric Oxide) 생성 저해 효과

RAW 264.7 cell을 24-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 그리

고 2시간 후 1 μg/ml의 농도로 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well의 상등액 100 μl와 동량의 Griess reagent를 혼합하고 15분간 반응시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 농도는 nitrite standard solution에서 얻어진 standard curve를 이용하여 산출하였다.

4) 디스크확산법을 활용한 항균 활성 측정

L. gasseri, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 산약 에탄올 추출물의 항균능은 디스크 확산법을 이용하여 측정하였다(Balouiri 등, 2016). 두 균주 모두 NCCLS Guide Line M11-A6에 준하여 실험하였다. 각 균들을 20 μL씩 점적 후 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk(Advantec, Toyo Roshi, Ltd., Tokyo, Japan)를 평판배지의 표면에 밀착시킨 후 125, 250, 500 mg/ml 농도별로 각각 30 μl씩 점적하고 37 °C로 유지된 혐기성 배양기(5 % CO₂, 10 % H₂, 및 85 % N₂)에서 24시간 동안 배양 후 생성된 투명한 환의 직경을 측정하여 항균 활성능을 캘리퍼를 이용하여 측정하였고, 모든 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

5) 성장억제 효과

산약 에탄올 추출물의 성장억제 효과를 확인하기 위해서 액체배지희석법을 이용하였다(Kwon 등, 2017). *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*를 BHI broth에서 37 °C, 24시간 동안 배양한 후 OD₆₀₀값이 .3~.5가 되도록 희석하여 사용하였다. 액체배지에 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*를 각각 20 μL씩을 접종한 후 산약 에탄올 추출물을 125, 250, 500 mg/ml 농도별로 30 μl씩 희석하고 37 °C shaking incubator(200 x rpm)에서 배양하였다. 접종 후 3, 6, 12, 18, 24시간이 되었을 때 microplate reader(BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회씩 반복하여 실시하였다.

$$\text{성장 저해율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{추출물 함유군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3. 통계적 방법

산약 에탄올 추출물의 NO 저해 효과와 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis* 대한 항균력을 비교하기 위하여 SPSS 26.0(Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치분산 분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후분석은 Duncan기법을 실시하였다. 통계 유의수준은 .05로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 산약 에탄올 추출물의 세포 생존율

산약 에탄올추출물(DBEE)의 농도에 따른 세포 생존율은 WST-1 시험법을 이용하였다. 대조군 100 %일 때 10 mg/ml 97.1 %, 25 mg/ml 95.4 %, 50 mg/ml 90.5 %, 100 mg/ml 75.5 %로 보여 세포독성이 없음을 확인하였다 (Fig 1).

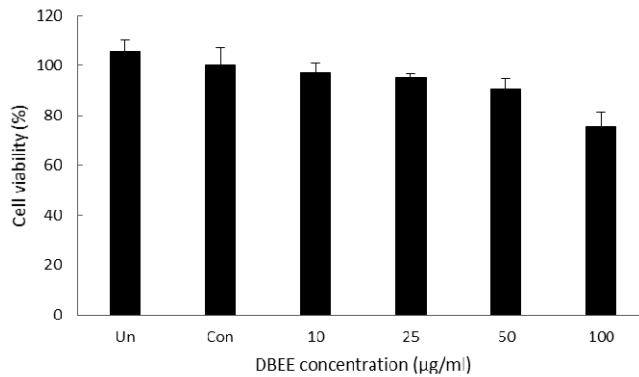


Fig 1. Effect of DBEE on cell viability in LPS stimulated RAW 264.7 cells

2. 산약 에탄올 추출물의 NO 생성 저해 효과

산약 에탄올추출물(DBEE)의 농도에 따른 NO 생성 저해 효과는 10 µg/ml에서부터 저해 효과가 나타났으며, 농

도가 높을수록 저해 효과는 커져 농도 의존적이었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p<.001)(Fig 2).

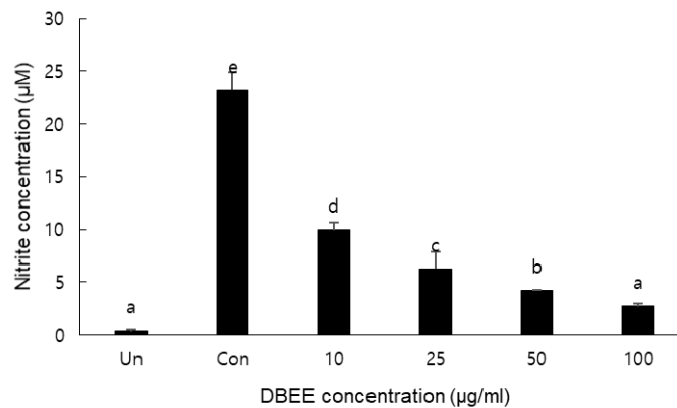


Fig 2. Effect of DBEE on NO production in LPS stimulated RAW 264.7 cells. Data represent the mean±SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan's multiple range test

3. 산약 에탄올 추출물에 대한 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 항균력

산약 에탄올 추출물의 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대해 디스크 확산법을 이용하여 항균 효과를 검증하였다. 측정 결과는 *L. gasseri*는 125 mg/ml 18.97 mm, 250 mg/ml 22.98 mm, 500 mg/ml 26.68 mm로 농도가 높을수록 항균력이 높았고($p < .001$), *S. mutans*는 125 mg/ml

19.04 mm, 250 mg/ml 22.77 mm, 500 mg/ml 24.50 mm로 농도가 높을수록 항균력이 높았으며, *P. gingivalis*는 125 mg/ml 14.72 mm, 250 mg/ml 17.75 mm, 500 mg/ml 19.19 mm로 농도가 높을수록 항균력이 높았다(Table 1). 또한 산약 에탄올 추출물의 동일 농도에서는 125 mg/ml과 250 mg/ml에서는 *L. gasseri*, *S. mutans*가 높았고, 500 mg/ml에서는 *L. gasseri*에 대한 항균력이 높아 차이를 보였다(Fig 3).

Table 1. Antibacterial activity of against DBEE *L. gasseri*, *S. mutans*, and *P. gingivalis*

	Treatment conc. (mg/ml)	Inhibition zone diameter	t/F	p
<i>L. gasseri</i>	125	18.97±.17 ^a	125.55	<.001
	250	22.98±.32 ^b		
	500	26.68±.97 ^c		
<i>S. mutans</i>	125	19.04±.10 ^a	122.01	<.001
	250	22.77±.52 ^b		
	500	24.50±.55 ^c		
<i>P. gingivalis</i>	125	14.72±.31 ^a	87.20	<.001
	250	17.75±.21 ^b		
	500	19.19±.63 ^c		

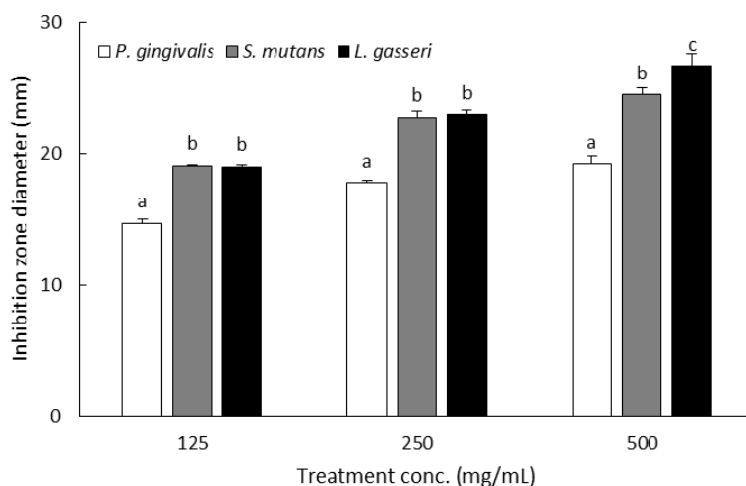


Fig 3. Antibacterial effects of DBEE according to the type and concentration of bacteria

4. 산약 에탄올 추출물의 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 성장억제 효과

산약 에탄올추출물을 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml의 농도별로 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*를 접종하

여 3시간, 6시간, 12시간 18시간, 24시간씩 배양 후 시간대별로 흡광도 600 nm에서 측정하였다. *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 DBEE에서의 성장억제 효과는 농도가 높을수록 억제 효과가 높아 농도 의존적이었다.

구체적으로 *L. gasseri*의 성장억제 효과는 24시간 경과 후 양성대조군 .687 대비 125 mg/ml .238, 250 mg/ml .278, 500 mg/ml .292로 억제 효과가 나타났으며 125 mg/ml에서 가장 낮았다. *S. mutans*의 성장억제 효과는 24시간 경과 후 양성대조군 .627 대비 125 mg/ml .355, 250 mg/ml .312,

500 mg/ml .291로 농도가 높을수록 성장억제 효과가 높았다. *P. gingivalis*의 성장억제 효과는 24시간 경과 후 양성대조군 .595 대비 125 mg/ml .274, 250 mg/ml .271, 500 mg/ml .261로 농도가 높을수록 억제 효과가 높았다(Fig 4).

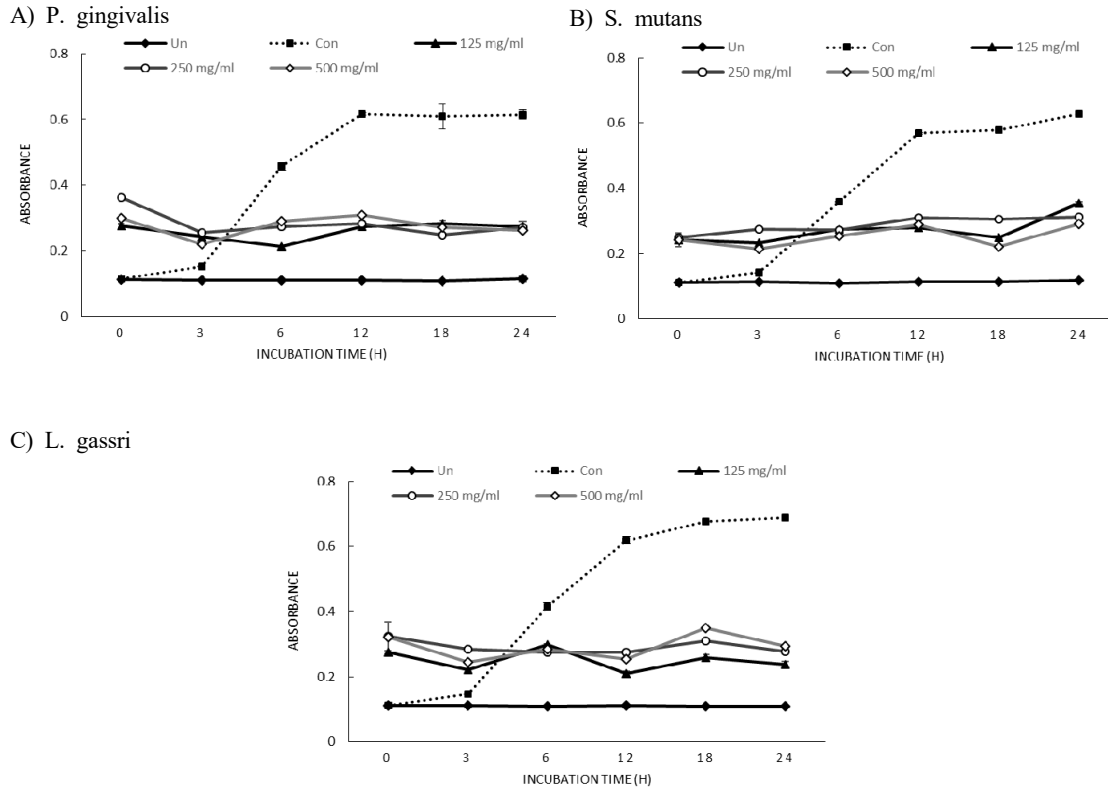


Fig 4. Growth inhibitory effects of DBEE on *L. gasseri*, *S. mutans*, and *P. gingivalis*

IV. 고 찰

치아우식증과 치주질환은 감염성 질환으로 구강 내에는 700 여종의 세균이 있으며(Kim 등, 2017), 성인의 60% 이상은 치주질환과 치아우식증에 이환된 것으로 보고되고 있다(Aas 등, 2005). 이를 예방하고 관리하기 위하여 다양한 칫솔을 포함한 구강관리용품으로 물리적 요법을 실천하며, 가글과 클로로헥시딘과 같은 양치액을

이용하여 화학적 요법을 실행하고 있다(Choi 등, 2020). 그러나 가글에는 알코올 성분과 클로로헥시딘의 경우 점막 통증 및 착색, 작열감 등의 다양한 부작용을 야기하고 있어 부작용이 적은 식용이 가능한 천연물질에 대한 관심과 선호도가 높아지고 있다(Yoon & Park, 2018).

이에 본 연구에서는 건강식으로 복용하고 산약(*Dioscorea batatas*)은 뿌리나 줄기를 건조하여 약제로 활용하였으며, 주성분인 methyl protoneogracillin, methyl protodioscin, dioscin, gracillin 등 면역증진, 골다공증 억

제, 항암효과 및 항염, 항산화 효과 등이 있다(Park 등, 2015). 이에 본 연구에서는 산약 에탄올추출물을 이용하여 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 항균 효과를 검증하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

본 연구에서 산약 에탄올 추출물의 세포 생존율은 10 mg/ml 97 %, 25 mg/ml 95 %, 50 mg/ml 90 %, 100 mg/ml 75 %로 Park 등(2020)의 연구에서 산약에서 50 μ M에서 RAW 264.7 세포에서 생존률이 85 %였고, Lee 등(2015)의 연구에서는 마우스 흑색 세포종인 B16F10을 사용하여 50 mg/ml에서 82 %의 생존율을 보였다. 두 연구 결과 모두 본 연구결과와 유사한 결과를 보였으며, 이는 세포 독성이 낮은 것으로 판단된다.

산약 에탄올 추출물의 NO 생성 저해 효과는 10 μ g/ml에서부터 효과가 나타났으며, 농도가 높을수록 효과가 더욱 높았다. 이는 An 등(2014)의 연구에서 50 μ g/ml 산약 추출물이 NO 생성을 효과적으로 감소시켜 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

산약 에탄올추출물의 항균 효과는 농도가 높을수록 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 항균 효과는 높아졌다. 이는 박하추출물을 이용한 연구와 유사한 결과를 보였다(Choi 등, 2020). 구체적으로 본 연구에서는 *L. gasseri*는 125 mg/mL 18.97 mm, *S. mutans*는 125 mg/mL 19.04 mm, *P. gingivalis*는 125 mg/ml 14.72 mm로 나타났고, 박하추출물에서는 *S. mutans*는 15.70 mm, *P. gingivalis* 14.00 mm로 저해환이 나타났고 저해환의 크기는 시료의 농도와 처리량에 따라 다소 차이를 보였으나 비율적으로 계산하였을 때 유사한 결과를 보였고 두 시료 모두 *P. gingivalis*보다 *S. mutans*에 대한 항균 효과가 높았다.

산약 에탄올추출물을 농도별로 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*균에 대한 성장억제 효과는 125 mg/ml에서 나타났으며, 6시간부터는 양성대조군 대비 억제 효과를 보였고 *S. mutans*, *P. gingivalis*는 농도 의존적으로 성장억제 효과가 나타났다. 이는 뽕잎 추출물을 이용한 *S. mutans*에 대한 성장억제 결과 12시간부터 급격히 감소하는 효과를 보였으며 농도 의존적으로 성장억제 효과가 나타나 본 연구와 유사한 결과를 보였다(Jung 등, 2012). *P. gingivalis*는 6시간부터 125 mg/ml에서 성장억제 효과를 타나 내기 시작하여 지속적으로 감소하는 경향을 보였고 이는 레몬글라스 에탄올추출물(Yoon & Park, 2023)

에서 12시간부터 효과를 보인 것과는 다소 차이를 보이거나 농도 의존적으로 성장억제 효과를 보이는 것은 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 또한 바질 오일을 이용한 연구에서는 *S. mutans*는 12시간부터, *P. gingivalis* 균주에서는 6시간부터 성장억제 효과를 보였으며 농도 의존적으로 성장억제 효과가 있어 본 연구와 유사한 결과를 보였다(Yoon & Park, 2018). 이는 에탄올 추출물과 정유 추출물 모두 유사한 결과를 보이며, 다만 농도에 있어서는 차이를 보였다.

본 연구는 구강질환의 대표균주를 이용하여 산약 에탄올추출물의 항균 효과와 성장억제 효과를 검증한 결과 모든 균주에서 효과를 보였다. 그러나 *L. gasseri*에 대한 연구가 이루어지지 않아 비교분석의 한계를 보였다. 또한 바이오필름 형성 억제 효과를 추가로 검증하여 산약 에탄올추출물의 구강 균주에 대한 효과성을 높여야 할 것이다. 식용과 약제로 사용되는 산약의 기능성을 지속적으로 검증하여 치면세균막관리 방법 중 하나인 화학적 요법의 대체물질로 활용 가능성을 높이고자 한다.

V. 결론

본 연구에서는 치아우식증과 치주질환의 대표균주인 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대한 산약 에탄올추출물의 항균 효과를 검증하고자 세포 생존율과 NO 저해 효과, 디스크확산법을 이용한 항균 효과를 측정하고 성장억제 효과를 측정 분석하였다. 산약 에탄올 추출물의 세포 생존율은 RAW 264.7 세포에서 검증한 결과 독성이 거의 나타나지 않았고, NO 생성 저해 효과 또한 10 μ g/ml에서 나타나 농도가 높을수록 저해 효과가 높았다. 디스크확산법을 이용한 항균능은 *L. gasseri*는 125 mg/ml 18.97 mm, *S. mutans*는 125 mg/ml 19.04 mm, *P. gingivalis*는 125 mg/ml 14.72 mm로 저해환의 크기가 가장 낮은 농도에서 나타났고 대체로 농도가 높을수록 저해 효과가 크게 나타났다. 산약 에탄올추출물을 농도별로 *L. gasseri*, *S. mutans*, *P. gingivalis*균에 대한 성장억제 효과는 125 mg/ml에서 나타났으며, 6시간부터는 양성대조군 대비 억제 효과를 보였고 *S. mutans*, *P. gingivalis*는 농도 의존적으로

로 성장억제 효과가 나타났다.

본 연구를 통해 식용과 약재로 사용되는 산약에 대한 치아우식증과 치주질환의 항균 효과를 검증함으로써 구강 가글과 세치제 또는 예방 및 치료제 조성물로서 활용 가능성을 보였으며, 추가적인 연구를 통해 효율성이 가장 높은 농도를 찾아 다양하게 적용해 보아야 할 것이다.

참고문헌

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al(2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.
- An SM, Kim HG, Choi EJ, et al(2014). Screening for anti-inflammatory activities in extracts from Korean Herb Medicines. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 40(1), 95-108. <http://doi.org/10.15230/SCSK.2014.40.1.95>.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK(2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Choi BBR, Yun SE, Park SR, et al(2020). Effectiveness of mentha extracts against oral microorganisms: an in vitro study. *J Korean Acad Oral Health*, 44(2), 67-72. <https://doi.org/10.11149/jkaoh.2020.44.2.67>.
- Choi YR, Choi MS, Kwun HS, et al(2019). The inhibitory effect of porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) on Astragali radis extract. *J Korean Soc Oral Health Sci*, 7(1), 46-50. <https://doi.org/10.33615/jkohs.2019.7.1.46>.
- Eom S, Choi YJ, Kwon SJ(2021). Effects of preventive knowledge about two major oral diseases on the correct use of oral hygiene products and oral disease preventive practice of middle-aged class. *J Korean Soc Oral Health Sci*, 9(4), 62-69. <https://doi.org/10.33615/jkohs.2021.9.4.62>.
- Hahn CL, Falkler Jr WA, Minah GE(1991). Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol*, 36(2), 147-153. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(91\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90077-8).
- Han SM, Hong IP, Woo SO, et al(2016). Anticariogenic activity purified bee venom (*Apis mellifera* L.) against four cariogenic bacteria. *Korean J Pharmacogn*, 47(1), 43-48.
- Hwang YJ, Cho YS, Lee SY(2015). Awareness and satisfaction of health insurance coverage of dental scaling. *J Dent Hyg Sci*, 15(5), 620-627. <http://doi.org/10.17135/jdhs.2015.15.5.620>.
- James P, Worthington HV, Parnell C, et al(2017). Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), Printed Online. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD008676.pub2>.
- Jung EJ, Choi CH, Choi JL, et al(2012). Growth inhibitory effect of mulberry leaf extract on *Streptococcus mutans* in vitro. *J Korean Acad Oral Health*, 36(1), 26-31.
- Kim HS, Park MJ, Kim SJ, et al(2021). Antibacterial and antibiofilm activities of Leaf extracts of *stewartia koreana* against *porphyromonas gingivalis*. *J Life Sci*, 31(3), 330-337. <https://doi.org/10.5352/JLS.2021.31.3.330>.
- Kim KE, Ahn ES, Han JH(2015). Variation in the index of dental plaque removal and practice assessment after instruction on toothbrushing. *J Dent Hyg Sci*, 15(2), 220-225. <http://doi.org/10.17135/jdhs.2015.15.2.220>.
- Kim MY, Hwang HJ, Kang KH(2022). Antibacterial and phagocytosis control of natural extracts on *S. mutans*. *J Korea Converg Soc*, 13(5), 113-117. <https://doi.org/10.15207/JKCS.2022.13.05.113>.
- Kim SY, Woo DH, Lee MA, et al(2017). Red fluorescence of oral bacteria interacting with *porphyromonas gingivalis*. *J Korean Acad Oral Health*, 41(1), 22-27. <http://doi.org/10.11149/jkaoh.2017.41.1.22>.
- Kwon PS, Kim DJ, Park H(2017). Improved antibacterial effect of blending essential oils. *Korean J Clin Lab Sci*, 49(3), 256-262. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2017.49.3.256>.
- Lee HW, Lee P, Kwon HJ, et al(2013). Antimicrobial

- activity of extracts from some traditional oriental medicinal plants against dental caries bacteria. *J Dent Hyg Sci*, 13(1), 45-52.
- Lee SY, Yoo DH, Joo DH, et al(2015). Inhibitory efficacy of dioscoreae rhizoma on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, PKA and ERK expression in melanoma cells (B16F10). *Korean J Herbol*, 30(4), 95-100. <http://doi.org/10.6116/kjh.2015.30.4.95>.
- Lim SW, Lee SH, Hur JM, et al(2011). The inhibitory effect of fermented dioscoreae batatas extract on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *Yakhak Hoeji*, 55(5), 404-410.
- Pai MR, Acharya LD, Udupa N(2004). Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel—a 6-week clinical study. *J Ethnopharmacol*, 90(1), 99-103. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.035>.
- Park EJ, Lee JS, Choi WS(2011). Anti-cariogenic activities of mushroom extracted with various solvent systems. *Korean J Food Sci Technol*, 43(6), 783-786. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.6.783>.
- Park MK, Cho SH, Ahn TK, et al(2020). Immunomodulatory effects of β -sitosterol and daucosterol isolated from dioscorea batatas on LPS-stimulated RAW 264.7 and TK-1 cells. *J Life Sci*, 30(4), 359-369. <https://doi.org/10.5352/JLS.2020.30.4.359>.
- Park YM, Lim JH, Seo EW(2015). Effect of dioscorea rhizoma on gastritis by acute gastric ulcer in rats. *Korean J Plant Res*, 28(1), 1-8. <http://doi.org/10.7732/kjpr.2015.28.1.001>.
- Yang MH, Yoon KD, Chin YW, et al(2009). Phytochemical and pharmacological profiles of *Dioscorea* species in Korea, China and Japan. *Korean J Pharmacogn*, 40(4), 257-279.
- Yoon HS, Park CM(2018). Anti-bacterial effects of basil oil on streptococcus mutans and porphyromonas gingivalis. *J Korean Soc Integr Med*, 6(3), 131-139. <https://doi.org/10.15268/ksim.2018.6.3.131>.
- Yoon HS, Park CM(2023). Antibacterial activity of lemongrass oil and lemongrass ethanol extract against porphyromonas gingivalis. *J Korean Soc Oral Health Sci*, 11(1), 107-113. <https://doi.org/10.33615/jkohs.2023.11.1.107>.
- You EJ, Cho JW, Yoo HJ, et al(2022). Antimicrobial effects of green tea extract-containing dentifrice. *J Korean Acad Oral Health*, 46(4), 174-178. <https://doi.org/10.11149/jkaoh.2022.46.4.174>.
- Healthcare Bingdate Hub. Outpatient frequent disease statistics, 2010~2021. Available at <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapHifrqSickInfo.do> Accessed April 5, 2023.